



# Diversité structurelle et fonctionnelle des communautés bactériennes de la phycosphère des cyanobactéries proliférant au sein des écosystèmes lacustres

Imen Louati

## ► To cite this version:

Imen Louati. Diversité structurelle et fonctionnelle des communautés bactériennes de la phycosphère des cyanobactéries proliférant au sein des écosystèmes lacustres. Ecosystèmes. Université Pierre et Marie Curie - Paris VI, 2015. Français. NNT : 2015PA066262 . tel-01239739

**HAL Id: tel-01239739**

**<https://theses.hal.science/tel-01239739>**

Submitted on 8 Dec 2015

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

# Université Pierre et Marie Curie

Ecole Doctorale Sciences de la Nature et de l'Homme : évolution  
et écologie

Institut d'écologie et des sciences de l'environnement de Paris  
Equipe Communautés microbiennes dans les écosystèmes continentaux

## **Diversité structurelle et fonctionnelle des communautés bactériennes de la phycosphère des cyanobactéries proliférant au sein des écosystèmes lacustres**

Par Imen Louati

Thèse de doctorat en Ecologie Microbienne

Dirigée par Julie Leloup et Jean-François Humbert

Présentée et soutenue publiquement le 8 octobre 2015

Devant un jury composé de :

Julie Leloup	Maître de conférences	Directrice de thèse
Jean-François Humbert	Directeur de Recherche	Directeur de thèse
Delphine Latour	Maître de conférences	Rapporteur
Ludwig Jardillier	Maître de conférences	Rapporteur
Guennadi Sezonov	Professeur	Examineur
Olivier Pringault	Directeur de Recherche	Examineur









## Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier Delphine Latour et Ludwig Jardillier d'avoir accepté d'être les rapporteurs de mes travaux ainsi que Guennadi Sezonov et Olivier Pringault d'en être les examinateurs. Je remercie aussi les financeurs de ma thèse, à savoir Emergence-UPMC (EME 1113) pour mon allocation de thèse et le projet Phycocyano (ANR-11-JSV7-0014) pour le financement de mes travaux.

Mes remerciements vont également à Luc Abbadie qui m'a accueilli au sein de son laboratoire à *iEES*-Paris. Je remercie également Julie Leloup de m'avoir encadré et d'avoir dirigé mon travail durant ces trois ans de thèse ainsi que Jean-François Humbert qui m'a beaucoup aidé à murir ma réflexion scientifique.

A l'issu de cette thèse, je réalise que son aboutissement a été notamment possible grâce au soutien et la générosité de plusieurs personnes autour de moi et que je tiens à remercier chaleureusement.

Tout d'abord, je tiens à remercier Didier Debroas, le premier professeur que j'ai contacté en arrivant en France et grâce à qui je me suis passionnée pour l'écologie microbienne. Merci de m'avoir accueilli au sein de l'équipe Microbiologie de l'Environnement et Bioinformatique, de m'avoir encadré pendant mes stages de Master et d'avoir aussi contribué à ma thèse en faisant parti de mon comité de suivi de thèse.

Je tiens également à remercier l'équipe Comic. J'ai eu la chance de travailler dans une équipe dynamique autant par la composition de ses membres que par son activité scientifique, ce qui m'a beaucoup enrichi. Je souhaiterais tout d'abord remercier la chef d'équipe Emma Rochelle-Newall. Si je devais écrire toutes les raisons pour lesquelles je remercie Emma, il me faudrait beaucoup de pages de remerciements. Pour faire court, j'adresse donc un grand merci à Emma pour ses qualités humaines exceptionnelles, pour son écoute, son encouragement, sa bonne humeur et pour avoir fait plus que le nécessaire pour m'aider et m'offrir de bonnes conditions de travail. Je remercie aussi chaleureusement Kevin dont les railleries et les râles vont certainement me manquer. Je remercie aussi Noémie de m'avoir aidé pour les premiers pas sur R. Merci aussi à Anouk pour son aide et les échanges intéressants qu'on a eu concernant les traitements bioinformatiques et les analyses statistiques des données pyro. Merci aussi à Isy pour son sourire constant et ses encouragements en lui souhaitant bon courage pour la fin de sa thèse. Merci à Marie-Anne de m'avoir montré les petits secrets du clonage. Merci aussi à Jennifer Tambosco, Jacques Pedron et à Frédérique van Gijsegem.

Ensuite je tiens à remercier les compagnons de galère à savoir tous les thésards du laboratoire avec lesquels j'ai pu partager l'expérience de la thèse. Merci aux anciens: Guillaume, les deux Benoit, Aurore, Solène, Alix et Henri. Voir l'aboutissement du long travail de ces personnes m'a donné envie de finir le mien. Un merci aussi à Aleks, qui malgré sa situation difficile a su m'encourager. Merci à

Floriane, Kejun et Ludo pour leur gentillesse, à Raphael pour nous fournir en Snickers et à Catalina qui malgré les barrières de la langue a toujours montré une grande ouverture. Je tiens à remercier particulièrement Ambre, aka La grande blonde aka Ma louloute! J'ai adoré travailler dans le même bureau que toi. Merci pour toute l'énergie positive qui émane de toi. Merci pour ton soutien et ton aide et surtout merci pour tous les moments de détente. J'ai aucun doute sur le fait que tu vas avoir une thèse super géniale meuf! Merci aussi à Yann aka Yannou pour sa bonne humeur constante et d'avoir supporté le vacarme qu'on faisait avec Ambre.

Merci à JC, Xavier, Stephane, Elisa, David, Jacques Gignoux, Jaques Meriguet, Seb, Catherine et Paola et à toute les personnes du laboratoire qui, chacun à sa manière, m'ont aidé à m'intégrer dans la vie du laboratoire et m'ont appris beaucoup de chose autant sur le plan humain que scientifique.

Je remercie aussi mes amis, grâce auxquels je me rends compte qu'avoir des amis comme les miens est une chance. Merci à Naila et Diane pour leurs soutien et leurs générosité, j'ai beaucoup de chance de vous avoir rencontré en arrivant en France. A des moments, vous avez littéralement facilité ma vie. À mes amis tunisiens, merci d'être comme une deuxième famille pour moi, merci d'avoir excusé mes absences et d'avoir été là pour me rappeler que dans la vie il faut savoir lâcher par moments pour mieux reprendre. Merci à Aicha, Mehdi Kojak, Bochra, Aliya, Dali, Aziz, Mehdi Fanter et Yassine. Vous m'avez aidé à supporter les coups de barres et la grisaille de Paris. Un merci particulier à Wafa, Insaf, Tyga, Hichem, Gingo et à Zied que j'ai même fatigué par moments mais qui ont continué à être présent pour moi malgré la distance pour certains.

En plus d'avoir des amis géniaux, j'ai aussi une grande famille géniale! Que je tiens à remercier du fond du cœur! Je vous adore et espère que vous me pardonneriez mes absences. Je remercie plus particulièrement mon oncle Chedli, le meilleur oncle du monde, sans oublier son adorable femme Sondous. Merci pour votre aide et soutien.

Durant les moments durs de cette thèse je me suis souvent demandé: «Que serais-je devenue sans ma petite famille?». A mon petit frère Hassen qui a toujours réussi à me faire rire aux larmes. A mon petit papa et ma petite maman, je ne crois pas qu'il existe vraiment un mot qui peut exprimer à quel point je vous aime et à quel point je vous suis reconnaissante. Je crois que là aussi la chance a été de mon côté en ayant des parents magnifiques comme vous. Il suffit pour moi de me voir dans vos yeux pour ressusciter. Merci d'être ce que vous êtes. Je vous dédie tout ce travail.





## TABLE DES MATIERES

I.	INTRODUCTION GENERALE.....	1
1.	Contexte général.....	3
2.	Déterminisme des proliférations de cyanobactéries.....	4
2.1.	Capacités à se développer à de fortes températures.....	6
2.2.	Capacité à acquérir de l'énergie lumineuse et à résister à des conditions environnementales défavorables à leur survie.....	7
2.3.	Capacité à acquérir et à stocker les nutriments.....	9
2.4.	Capacité à résister à la prédation.....	11
3.	Interactions entre cyanobactéries et bactéries.....	12
3.1.	Concept de la phycosphère.....	12
3.2.	Phycosphère en milieu marin.....	13
3.3.	Phycosphère en milieu lacustre.....	16
4.	Hypothèses et objectifs.....	18
5.	Approches utilisées.....	20
6.	Organisation du manuscrit.....	21
II.	DIVERSITE ET CAPACITES METABOLIQUES DES PHYCOSPHERES CYANOBACTERIENNES.....	25
1.	Introduction.....	27
1.1.	Approche en milieu naturel.....	27
1.2.	Approche en milieu de culture.....	29
1.3.	Méthodologie.....	30
1.3.1.	Analyse des données de diversité structurelle.....	30
1.3.2.	Analyse des données de diversité fonctionnelle.....	31
2.	Diversité structurelle des phycosphères cyanobactériennes dans les milieux lacustres.....	33
3.	Diversités structurelles et fonctionnelles des phycosphères cyanobactériennes des milieux lacustres.....	53
III.	GROUPES FONCTIONNELS RESPONSABLES DU RECYCLAGE DE L'AZOTE ASSOCIEES AUX PHYCOSPHERES CYANOBACTERIENNES.....	83
1.	Introduction.....	85
1.1.	Cycle de l'azote dans les milieux aquatiques.....	85
1.1.1.	Fixation de l'azote.....	86
1.1.2.	Nitrification.....	87
1.1.3.	Dénitrification.....	87
1.2.	Méthodologie.....	88
1.2.1.	Approche quantitative.....	88
1.2.2.	Approche qualitative.....	89
2.	Distribution des groupes fonctionnels responsables du recyclage de l'azote au sein des phycosphères cyanobactériennes des milieux lacustres.....	91
IV.	SYNTHESE GENERALE ET PERSPECTIVES.....	117
V.	REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	137

VI.	ANNEXES.....	149
1.	Annexes 1: Pyroséquençage 454.....	151
2.	Annexes 2: Test <i>in silico</i> des amorces NC-Pr2.....	153
3.	Annexes 3: Biolog Ecoplate.....	154
4.	Annexes 4: Tableau II. S3.....	156
5.	Annexes 5: Tableau II. S1.....	170
6.	Annexes 6 : La PCR quantitative.....	192

## TABLE DES FIGURES

### CHAPITRE I

Figure I. 1.: Schéma récapitulatif des effets potentiels de l'eutrophisation et des changements climatiques sur la fréquence des proliférations des cyanobactéries....	4
Figure I. 2.: Principaux genres de cyanobactéries hétérocystées (A, B, C et D) et non hétérocystées (E, F, G et H).....	5
Figure I. 3.: Taux maximum de croissance pour quatre groupes taxonomiques de phytoplancton: les Cyanobactéries, les Chlorophycées, les Dinoflagellés et les Diatomées en fonction de la température.....	6
Figure I. 4.: Photo de formation d'écume par <i>Microcystis sp.</i> .....	7
Figure I. 5.: Concentration des cellules de <i>Planktothrix rubescens</i> entre 0 et 50 m au lac du Bourget en 2001.....	8
Figure I. 6.: Formation d'une chaîne d'akinetes par une cyanobactérie filamenteuse appartenant à l'ordre des Nostocales (indiquée par une flèche).....	8
Figure I. 7.: Effet de l'ajout de bactéries hétérotrophes sur les cultures de cyanobactéries.....	11
Figure I. 8.: Schéma conceptuel illustrant la fraction associée et la fraction libre au sein de la phycosphère.....	13
Figure I. 9.: Schéma conceptuel illustrant l'association phytoplanctons-bactéries hétérotrophes au sein de la phycosphère.....	13
Figure I. 10.: Photo en microscopie à contraste de phase de filaments d' <i>Anabaena spiroides</i> collectées durant une prolifération d' <i>Anabaena</i> dans le lac Okaro.....	15
Figure I. 11.: Représentation schématique des processus de transformation de l'azote qui peuvent potentiellement avoir lieu dans les agrégats de <i>Nodularia spumigena</i> représenté sur l'isoplette de O <sub>2</sub> autour et à l'intérieur d'un agrégat dans des conditions d'air saturé en O <sub>2</sub> .....	16
Figure I. 12.: Interactions métaboliques potentiellement bénéfiques entre les cyanobactéries et les bactéries hétérotrophes associées.....	17
Figure I. 13.: Représentation schématique des différentes étapes de transfert (sens des flèches) de composés azotés (en bleu) via les différentes transformations biologiques (en rouge) à l'interface de la zone oxique et anoxique dans les écosystèmes aquatiques.....	20

### CHAPITRE II

#### ARTICLE 1

Figure II. 1.: Correspondence analysis (CA) plot generated from the whole non cyanobacterial OTUs obtained with Eub-Pr1 (A) and NC-Pr2 (B) primer set, showing the distribution of the bacterial community after normalization to the smallest sample (n = 786 reads).....	41
--	----



Figure II. 2.: Relative abundance of the phyla and Proteobacteria classes, expressed as the proportion of the average number of reads from each sample after normalization to the smallest sample (n = 3402).....	42
Figure II. 3.: Distribution of the first 100 dominant bacteria OTUs at the order level, expressed as the proportion of the average number of reads obtained from each sample after normalization to the smallest sample (n = 3402 reads).....	44
Figure II. 4.: Venn diagram showing the unique and shared OTUs after normalization to the smallest sample (n = 3402 reads).....	45

## **SUPPLEMENTAL INFORMATION ARTICLE 1**

Figure II. S 1.: Relative abundance of the phyla obtained with with Eub-Pr1 and NC-Pr2 primer set, expressed as the proportion of the average number of reads after normalization to the smallest sample (n = 786 reads).....	50
---	----

## **ARTICLE 2**

Figure II. 1.: Comparative use of the 31 carbon substrates in the Biolog plates by the bacterial communities associated with cyanobacterial strains in culture belonging to four genera (a) and comparison of the Nitrogen use index by these bacterial communities (b).....	56
Figure II. 2.: Principal Component Analyses performed (a) on the use of the 31 carbon sources (Ecoplate approach) and (b) on the OTU composition (pyrosequencing approach) of the bacterial communities associated with the cyanobacterial strains in culture.....	57
Figure II. 3.: Relative abundance of main groups found in the bacterial communities associated with the four cyanobacterial genera in culture and with the two natural blooms of cyanobacteria after normalization to the smallest sample (n = 4284).....	58
Figure II. 4.: Venn diagram showing the distribution of all the bacterial OTU found in BC associated with the four cyanobacterial genera in culture, after normalization to the smallest sample (n = 4284).....	59
Figure II. 5.: Boxplot diagram of the distribution of abundance (number of reads) of each bacterial OTU found in bacterial communities associated with the cyanobacterial strains in culture as a function of the number of cyanobacterial strains where each of these OTU was found.....	60
Figure II. 6.: Rank-abundance distribution of the bacterial OTU found in association with the fifteen cyanobacterial strains in culture. The ranking of these bacterial OTU was first performed on the bacterial community associated with one <i>Anabaena</i> strain (Ana1) and this ranking was kept for all bacterial communities associated with other cyanobacterial strains in culture.....	60

## **SUPPLEMENTAL INFORMATION ARTICLE 2**

Figure II. S 1 : Comparative use of the 31 carbon substrates in the Biolog plates by the bacterial communities associated with all the cyanobacterial strains in culture..	71
--	----

Figure II. S 2.: Comparative use of the different families of carbon substrates in the Biolog plates by the bacterial communities associated with cyanobacterial strains in culture belonging to four genera.....	71
Figure II. S 3.: Distribution of 100 most abundant OTU identified in our study as a function of the number of sequences that were matched with at least a 98% sequence identity in GeneBank® .....	72
Figure II. S 4.: Richness (black histograms), Chao 1 (grey histograms) and Shannon (diamonds) values estimated in the bacterial communities associated with all cyanobacterial strains in culture and with the two natural bloom samples.....	72
Figure II. S 5.: Venn diagram showing the distribution of all the bacterial OTU found in BC associated with <i>Anabaena</i> and <i>Microcystis</i> strains in culture and in environmental blooms, after normalization to the smallest sample (n=11002).....	73

## CHAPITRE III

Figure III. 1.: Transformation de l'azote par les microorganismes dans un écosystème aquatique autour de l'interface oxique et suboxique.....	85
---	----

## ARTICLE 3

Figure III. 2.: Copy numbers of the <i>nifH</i> , <i>amoA</i> AOB, <i>nirS</i> , <i>nirK</i> and Bacterial, Cyanobacterial and Archaeal rRNA 16 genes in the attached (A) and free-living (F) fractions of <i>Anabaena</i> (AB) and <i>Microcystis</i> (MB) blooms (n=3; error bars represent standard deviations).....	95
Figure III. 3.: Maximum likelihood phylogenetic tree of amino acid <i>nifH</i> OTUs sequences recovered from this study (indicated by grey square) including the sample origin (the attached (A) and free-living (F) fractions of <i>Anabaena</i> (AB) and <i>Microcystis</i> (MB) blooms) with the number of sequences for each OTU and amino acid sequences of previously isolated <i>nifH</i> gene including accession numbers.....	99
Figure III. 4.: Abundance and diversity of <i>nifH</i> gene at the family level in the attached (A) and free-living (F) fractions of <i>Anabaena</i> (AB) and <i>Microcystis</i> (MB) blooms...	101

## SUPPLEMENTAL INFORMATION ARTICLE 3

Figure III. S 1.: Rarefaction analysis for the <i>nifH</i> sequence data. The curves were generated with non- <i>Anabaena nifH</i> operational taxonomic unit (98% identity, unique reads are considered as different OTU) for the attached (A) and free-living (F) fractions for <i>Anabaena</i> (AB) and <i>Microcystis</i> (MB) blooms.....	107
--	-----

## TABLE DES TABLEAUX

### CHAPITRE II

#### ARTICLE 1

Table II. 1.: Total cyanobacterial and non-cyanobacterial reads (mean $\pm$ standard deviation), observed bacterial richness and diversity indices obtained with both primer sets Eub-Pr1 and NC-Pr2.....	40
---	----

#### SUPPLEMENTAL INFORMATION ARTICLE 1

Table II. S 1.: Permutational MANOVA comparing bacterial community composition obtained with Eub-Pr1 and NC-Pr2 primer set (n=786).....	50
Table II. S 2.: Comparison (ANOVA) of number of reads, number of OTUs and diversity indexes after normalizing to the smallest sample (n = 786 reads).....	51
Table II. S 3.: Blast analysis on the abundant OTUs per sample (>1%) after normalization to the smallest sample (n = 3402 reads). (F) for free living fraction and (A) the associated faction, (AB) for the <i>Anabaena</i> and (MB) for the <i>Microcystis</i> blooms.....	51
Table II. S 4.: Physicochemical measurements of lakewater for both cyanobacterial blooms.....	51

#### ARTICLE 2

Table II. 1.: Richness, Chao1 and diversity values estimated in the bacterial communities associated with cyanobacteria in culture and with the two environmental samples.....	62
Table II. 2.: Characteristics of the cyanobacterial strains and environmental samples used in this study.....	67

#### SUPPLEMENTAL INFORMATION ARTICLE 2

Table II. S 1.: Description of the results of the BLAST analysis performed on the 100 most abundant OTU found in BC associated with cyanobacteria in culture.....	73
---	----





## **I. INTRODUCTION GENERALE**

---



## 1. Contexte général

Les écosystèmes lacustres ne représentent que 0,8% de la surface du globe (Gleick 1996) mais ils jouent un rôle central dans un grand nombre de cycles biogéochimiques (e.g. Cole et al. 2007). Ils fournissent également des services écosystémiques<sup>1</sup> majeurs dont dépendent les sociétés humaines (Brauman et al. 2007). Comprendre leur fonctionnement est donc un enjeu crucial. Ce fonctionnement repose sur un ensemble de processus (physiques, chimiques, biologiques) qui définissent les propriétés de ces écosystèmes. Ces processus sont largement dépendants de la nature et de la diversité des organismes présents ainsi que de leurs interactions (Hooper et al. 2005).

Le premier paramètre clef du fonctionnement des écosystèmes aquatiques est son compartiment photoautotrophe<sup>2</sup> qui assure la production primaire<sup>3</sup> (Kirchman 2012). Cette production primaire est réalisée principalement par des microorganismes phytoplanctoniques et dans une moindre mesure par les macrophytes au sein des écosystèmes peu profonds (Mitchell 1989). Le phytoplancton est constitué par l'ensemble des microorganismes photosynthétiques eucaryotes, représentés par les microalgues (e.g. Diatomées, Chlorophycées...), mais aussi par des procaryotes, représentés principalement par les cyanobactéries; ce compartiment phytoplanctonique contribue pour près de 50% de la production primaire globale (Field et al. 1998).

Dans les milieux lacustres, les communautés phytoplanctoniques regroupent une grande diversité de microorganismes qui présentent dans les climats tempérés, des variations saisonnières marquées en terme de biomasse et de composition (Sommer 1986). De plus, en raison de leur temps de génération très courts, les communautés phytoplanctoniques peuvent répondre de manière très rapide aux changements qui interviennent dans les conditions environnementales (Reynolds 2006, Elliott 2012). L'une des manifestations les plus spectaculaires qui peuvent survenir en réponse à ces modifications dans les apports en nutriments ou dans les variables climatiques concerne la survenue de proliférations de cyanobactéries dans

---

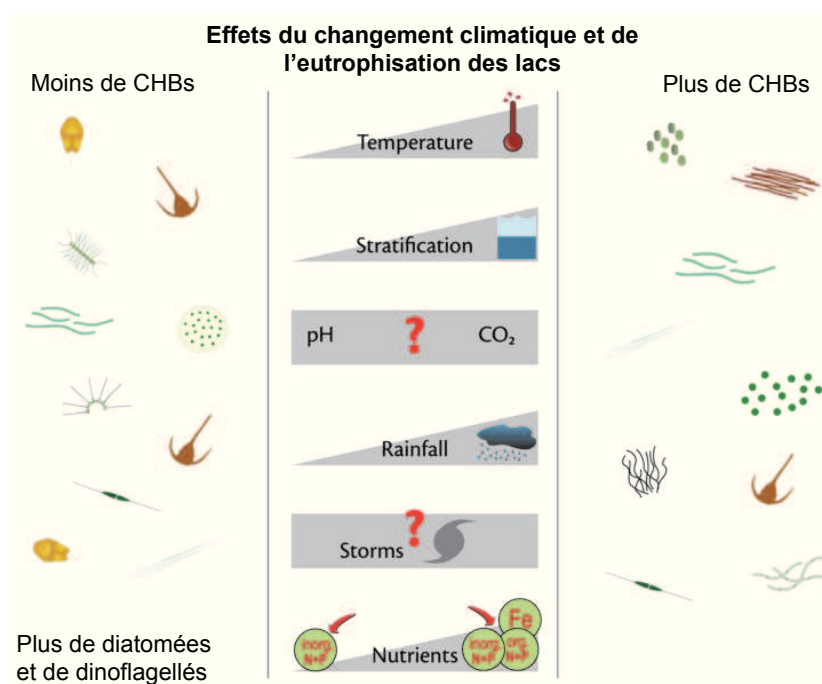
<sup>1</sup> Les services écosystémiques reposent sur les processus fonctionnels des écosystèmes dont les

<sup>2</sup> Organismes capables d'utiliser la lumière comme source d'énergie et le CO<sub>2</sub> comme source de carbone

<sup>3</sup> Quantité totale de matières organiques fixées par photosynthèse



les milieux aquatiques eutrophes<sup>4</sup> (Paerl et al. 2001). Par ailleurs, plusieurs études prédisent que les effets combinés des changements climatiques et de l'enrichissement des plans d'eau en nutriments majeurs (azote (N) et phosphore (P)) vont amplifier dans les années futures la fréquence et l'intensité de ces proliférations de cyanobactéries dans les écosystèmes d'eau douce (Figure I. 1.) (Paerl & Otten 2013).



**Figure I. 1.: Schéma récapitulatif des effets potentiels de l'eutrophisation et des changements climatiques sur la fréquence des proliférations des cyanobactéries.** (CHBs pour Cyanobacterial Harmful Algal bloom) (d'après O'Neil et al. 2012)

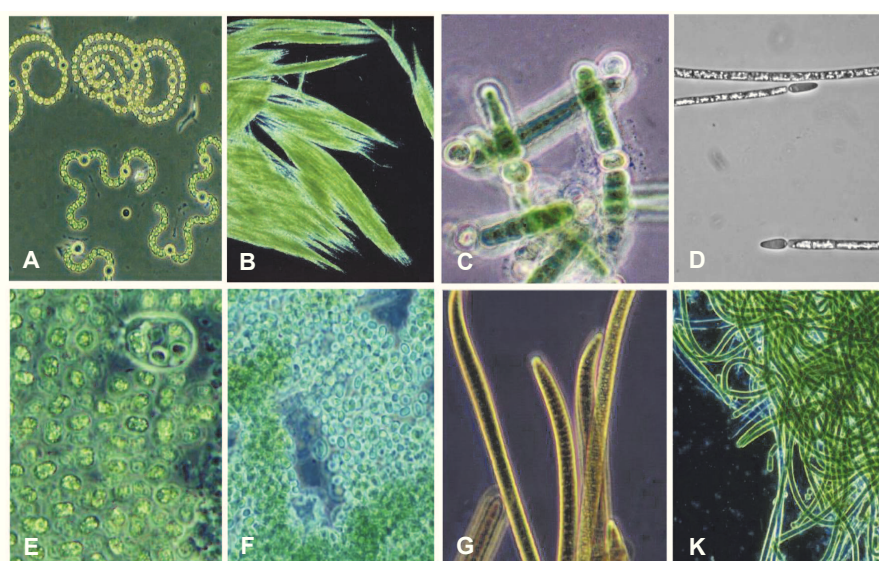
Les proliférations de cyanobactéries représentent un enjeu majeur pour les gestionnaires et les utilisateurs des plans d'eau car elles perturbent le fonctionnement de ces écosystèmes ainsi que leurs usages (Paerl & Paul 2012). Une compréhension du déterminisme de leur apparition, de leur durée puis de leur disparition est donc indispensable si l'on veut mieux gérer ces phénomènes et limiter leur incidence pour l'Homme.

## 2. Déterminisme des proliférations de cyanobactéries

Les cyanobactéries sont les plus vieux microorganismes photosynthétiques (photosynthèse oxygénique) connus. Elles seraient responsables de la modification de l'atmosphère terrestre il y a plus de deux milliard d'années en l'enrichissant en

<sup>4</sup> Milieu eutrophe : milieu riche en éléments nutritifs

oxygène (Schirrmeister et al. 2013). Les cyanobactéries présentent une large gamme d'organisations morphologiques (Figure I. 2.) et elles ont développé un ensemble de stratégies qui leur a permis de coloniser la plupart des écosystèmes terrestres (sols, glaciers, grottes, rochers, désert) et aquatiques (eau douce, marins, saumâtres). Leurs capacités d'adaptation leur permettent de survivre et de se développer dans des conditions très variées de température (aussi bien dans les glaciers que dans les sources thermales), de salinité (des lacs hypersalés aux lacs oligohalins), de pH (aussi bien dans les eaux carbonatées que dans les tourbières acides) et de luminosité (aussi bien dans les grottes à faible éclaircissement que dans les lacs tropicaux) (Whitton 2012).



**Figure I. 2.: Principaux genres de cyanobactéries hétérocystées (A, B, C et D) et non hétérocystées (E, F, G et H).** A: colonies d'*Anabaena flos-aquae* et *A. Spiroides*, B: Colonies d'*Aphanizomenon flos-aquae*, C: *Nodularia* sp., D: *Cylandrospermopsis raciborskii*, E: Colonies de *Microcystis aeruginosa*, F: Cyanobactéries coccoïdes non identifiées, G: Filaments d'*Oscillatoria* sp., K: Filaments agrégés de *Lyngbya* sp. (photo issue de Paerl et al. 2001)

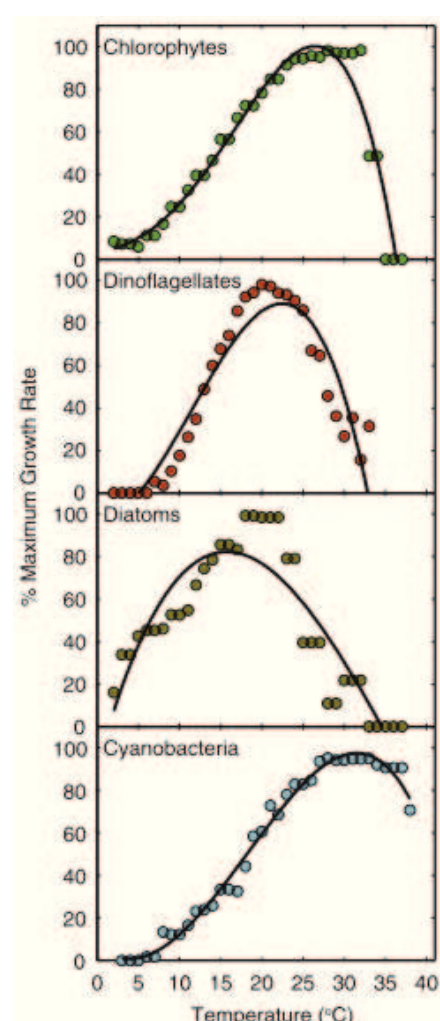
Les conditions qui permettent le développement des proliférations de cyanobactéries sont bien connues et elles sont généralement associées à trois facteurs principaux à savoir des concentrations élevées en nutriments (N et P), une stabilité de la colonne d'eau et des conditions de forte lumière et température (Paerl & Fulton 2006). Or, ces conditions sont favorables à la plupart des microorganismes phytoplanctoniques (Reynolds 2006), ce qui rend particulièrement intéressant de comprendre pourquoi dans des conditions qui permettent de générer de fortes

biomasses, ce sont le plus souvent les cyanobactéries qui dominent ces communautés.

Nous présenterons donc ci-dessous les principales caractéristiques des cyanobactéries qui peuvent expliquer leur dominance dans les écosystèmes aquatiques eutrophes.

## 2.1. Capacités à se développer à de fortes températures

Comme presque tous les procaryotes, les cyanobactéries atteignent un taux maximal de croissance à des températures élevées (Coles & Jones 2000) (de 20°C pour *Aphanizomenon flos-aquae* et *Planktothrix agardhii*, à 30°C pour *Cylindrospermopsis raciborskii*). A ces températures, les cyanobactéries sont en général plus compétitives que la plupart des microalgues eucaryotes (Figure I. 3.) (Jöhnk et al. 2008).



**Figure I. 3.: Taux maximum de croissance pour quatre groupes taxonomiques de phytoplancton: les Cyanobactéries, les Chlorophycées, les Dinoflagellés et les Diatomées en fonction de la température.** Les points représentent des moyennes glissantes de 5°C des pourcentages des taux maximums de croissance de 3 - 4 espèces différentes pour chaque groupe taxonomique considéré. Les lignes d'ajustements sont des polynômes de troisième ordre et soulignent la forme de la croissance par rapport la température. La ligne en pointée est utilisée pour la comparaison entre les cyanobactéries et les autres groupes. (Issue de Paerl (2014)).

En plus de ces effets directs de la température sur le taux de croissance, il faut signaler également que l'élévation des températures de l'eau favorisent une installation plus précoce de la stratification thermique dans les lacs et allongent la durée de cette stratification (Peeters et al. 2007). Cette dernière va favoriser les microorganismes possédant une capacité de flottaison leur permettant de se maintenir dans l'épilimnion<sup>5</sup>, ce qui est le cas de nombreuses cyanobactéries grâce à leurs vésicules à gaz (Walsby 1994).

## **2.2.Capacité à acquérir de l'énergie lumineuse et à résister à des conditions environnementales défavorables à leur survie**

Lorsque la colonne d'eau est bien stratifiée, des genres de cyanobactéries tel que *Microcystis*, s'accumulent en surface grâce à leurs vésicules à gaz pour former une écume (Figure I. 4.) qui leur permet d'éliminer leurs compétiteurs en leur limitant l'accès à la lumière (Paerl & Ustach 1982).



**Figure I. 4.: Photo de formation d'écume par *Microcystis sp.*** (Photo N.Pascault)

D'autre espèce tel que *Planktothrix rubescens* peuvent occuper une couche d'eau plus profonde, le métalimnion<sup>6</sup> (Figure I. 5.), dans certains lacs alpins (e.g.

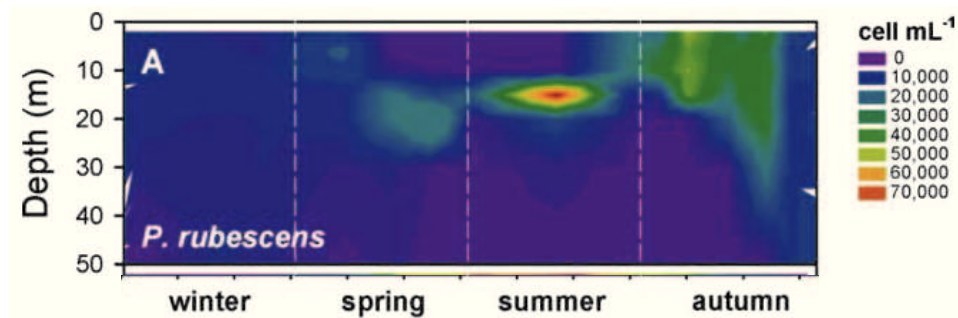
---

<sup>5</sup> Epilimnion: couche d'eau supérieure d'un lac stratifié, homogénéisée par le vent, caractérisée par une forte température et une faible densité

<sup>6</sup> Metalimnion: ou thermocline, couche intermédiaire d'un lac stratifié, plus dense que l'épilimnion, elle est marquée par le déclin de la température par unité de profondeur



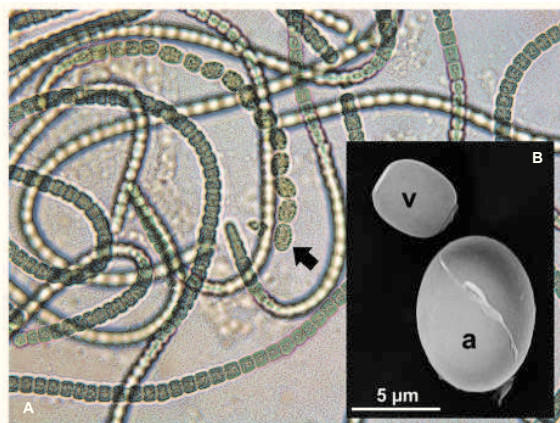
Jacquet et al. 2005). Grâce à la phycoérythrine, elles peuvent en effet soutenir une production photosynthétique à de très faibles intensités lumineuses et dans des longueurs d'ondes bien spécifiques (Oberhaus et al. 2007).



**Figure I. 5.: Concentration des cellules de *Planktothrix rubescens* entre 0 et 50 m au lac du Bourget en 2001.** (D'après Jacquet et al. 2005)

En complément de ces capacités à capter l'énergie lumineuse, les cyanobactéries sont aussi capables de synthétiser des composés qui les protègent des ultraviolets (e.g. mycosporine-like amino acid (Garcia-Pichel & Castenholz 1993)) et d'autres photoprotecteurs (caroténoïdes, Schagerl & Müller 2006) ce qui leurs permet d'occuper la surface des écosystèmes ou des rivières peu profondes dans lesquels la très forte exposition aux UV peut provoquer la mort de certains microorganismes.

Enfin, certaines cyanobactéries (*Anabaena* et *Aphanizomenon*) sont capables de différencier des cellules de résistance, appelées akinètes (Figure I. 6.), lorsque les conditions environnementales sont défavorables (Thiel & Wolk 1983). Ces cellules peuvent survivre dans les sédiments durant plusieurs années (Livingstone & Jaworski 1980). Lorsque les conditions environnementales redeviennent propices au développement des cyanobactéries, des cellules végétatives sont générées à partir de ces cellules de résistance.



**Figure I. 6.: Formation d'une chaîne d'akinètes par une cyanobactérie filamenteuse appartenant à l'ordre des Nostocales** (indiquée par une flèche). (A) Image de microscopie optique. (B) Fort grossissement au microscope électronique à balayage comparant la taille d'un akinète (a) à celle d'une cellule végétative (v) (Issue de Sciuto & Moro 2015)

D'autre genre tel que *Microcystis* ont développé un cycle de vie comportant une phase benthique de la fin de l'automne au printemps, puis une phase pélagique de l'été jusqu'à l'automne (Latour & Giraudet 2004, Sabart et al. 2014).

### **2.3. Capacité à acquérir et à stoker les nutriments**

Grâce à leurs vésicules de gaz et à la formation de formes multicellulaires (colonies et filaments) certaines espèces de cyanobactéries peuvent se déplacer dans la colonne d'eau des plans d'eau (Reynolds et al. 1987, Walsby et al. 1995). Elles sont ainsi capables de capter l'énergie lumineuse en surface puis de se déplacer vers les couches d'eau plus profondes, où les concentrations en nutriments minéraux peuvent être plus élevées du fait de leur recyclage au niveau des sédiments (Ibelings et al. 1991, Wallace et al. 2000).

L'enrichissement en nutriment des écosystèmes aquatiques, notamment en phosphore, qui favorise les proliférations de cyanobactéries (Schindler et al. 2008), se traduit généralement par un faible ratio N:P dans les lacs eutrophes (Downing & McCauley 1992). L'azote peut donc devenir limitant pour leur croissance et c'est pourquoi certaines espèces de cyanobactéries (e.g. *Aphanizomenon*, *Anabaena*) serait favorisées en raison de leurs capacités à fixer l'azote atmosphériques ( $N_2$ ) qui lui n'est jamais limitant (Tilman et al. 1982).

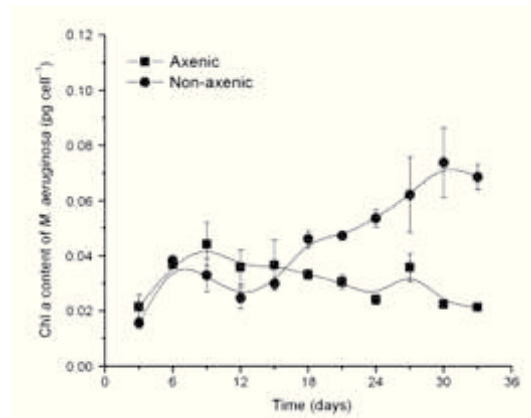
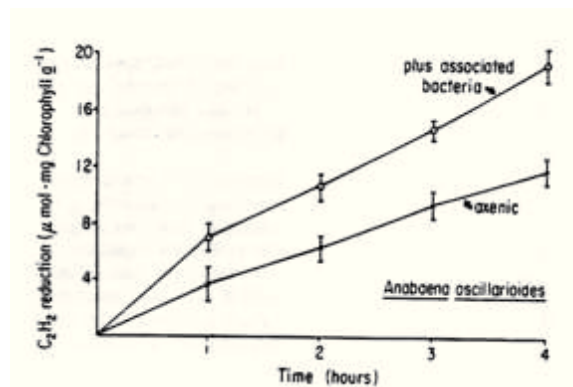
Cependant, le taux de fixation de  $N_2$  ne compense pas nécessairement la limitation en azote (Ferber et al. 2004, Dolman et al. 2012). De plus, des cyanobactéries non fixatrices de  $N_2$  (e.g. *Microcystis*) peuvent dominer dans les écosystèmes eutrophes même quand l'azote est limitant (Paerl et al. 2011), ce qui suggère que les cyanobactéries sont plus compétitives pour l'azote que les autres espèces phytoplanctoniques au delà du statut trophique du lac. En effet, l'étude de Marinho & De Oliveira E Azevedo (2007) montre que *Microcystis* peut produire plus de biomasse par unité d'azote que les diatomées.

L'ammonium ( $NH_4^+$ ) est la source d'azote la plus facilement assimilable par les cyanobactéries (Herrero et al. 2001). Aussi, lorsque l'azote est limitant, elles ont en plus la capacité d'assimiler plusieurs autres formes d'azote telles que le nitrate ( $NO_3^-$ ), l'ammonium ( $NH_4^+$ ), l'urée ( $[NH_2]_2CO$ ) ainsi que des acides aminés tel que l'alanine, afin de soutenir leur croissance (Chaffin & Bridgeman 2014). Certaines études mettent en évidence un lien entre l'expansion des proliférations de cyanobactéries actuellement observée et l'enrichissement des écosystèmes lacustres en composés azotés biodisponibles (Lewis & Wurtsbaugh 2008, Lewis et

al. 2011) à savoir l'azote organique dissout (DON pour Dissolved Organic Nitrogen) sous forme d'urée, qui est largement utilisé en agriculture (Yoshida et al. 2007, Finlay et al. 2010). Plus particulièrement, le  $\text{NH}_4^+$  et le  $[\text{NH}_2]_2\text{CO}$  favoriseraient les cyanobactéries non fixatrices de  $\text{N}_2$  (e.g. *Microcystis*, *Planktothrix*) dans les conditions eutrophes (Donald et al. 2011).

Certaines études suggèrent également que les cyanobactéries non fixatrices de  $\text{N}_2$  peuvent bénéficier des proliférations de cyanobactéries fixatrices de  $\text{N}_2$  (Beversdorf et al. 2013, Miller et al. 2013). Le développement des premières serait assuré grâce au  $\text{NH}_4^+$  relargué par les cyanobactéries fixatrices d'azote durant la fixation de  $\text{N}_2$  et grâce à l'azote inorganique dissout (DIN pour Dissolved Inorganic Nitrogen) rendu disponible suite au déclin des proliférations des cyanobactéries fixatrices du  $\text{N}_2$  (Caldwell Eldridge et al. 2013). Même si d'autres études avancent que la fixation de l'azote par les cyanobactéries ne peut pas modifier de manière significative le ratio N:P des écosystèmes lacustres (e.g. Scott & McCarthy 2010), la succession et/ou la coexistence de cyanobactéries fixatrices de  $\text{N}_2$  et de non fixatrices de  $\text{N}_2$  qui sont observées dans de nombreux écosystèmes suggère qu'il pourrait exister des interactions directes ou indirectes entre ces deux groupes fonctionnels de cyanobactéries.

Les cyanobactéries peuvent aussi être avantagées en établissant des relations de type mutualiste avec la communauté microbienne du milieu en utilisant par exemple directement le phosphore fourni par les bactéries qui leur sont attachées (Jiang et al. 2007), ou en augmentant l'efficacité de la fixation de  $\text{N}_2$  suite à la consommation de l'oxygène ( $\text{O}_2$ ) par les bactéries hétérotrophes (Paerl 1996b). Les taux de croissance plus importants des cultures non-axéniques de *Microcystis* par rapport aux cultures axéniques (Shen et al. 2011) et l'augmentation de la fixation de  $\text{N}_2$  et de la croissance de *Anabaena* (Paerl 1978) après addition de bactéries dans le milieu de culture (Figure I. 7.) suggèrent que ces interactions pourraient être très importantes pour le fitness des cyanobactéries



**Figure 1.7.: Effet de l'ajout de bactéries hétérotrophes sur les cultures de cyanobactéries.** (graphe de gauche, issu de Paerl 1996a) Augmentation de l'activité de la nitrogénase d'*Anabaena oscillarioides* (déterminée par la mesure de réduction d'acétylène) après ajout de *Pseudomonas aeruginosa* au milieu de culture et (graphe de droite, issu de Shen et al. 2011) différence de la croissance de *Microcystis aeruginosa* en culture axénique et non axénique

Les cyanobactéries bénéficient aussi de capacités importantes de stockage du phosphore sous forme de granules de polyphosphates ou d'azote, sous forme de cyanophycine, de phycocyanine (Kromkamp 1987) et de phycobiliprotéines (Wood & Haselkorn 1980) qui représentent un réservoir d'acides aminés qui peuvent être utilisés lorsque le milieu est appauvri en N ou en P.

## 2.4. Capacité à résister à la prédation

Les cyanobactéries ont développé des organisations cellulaires particulières qui leur permettent d'échapper à la pression de prédation. De nombreux genres de cyanobactéries peuvent s'organiser en filaments (e.g. *Anabaena*, *Planktothrix*, *Oscillatoria*) ou en colonies (e.g. *Microcystis*). La grande taille de ses formes filamenteuses et coloniales limite leur consommation par la plupart des organismes brouteurs du zooplancton (e.g. Yang et al. 2006, Yang & Kong 2012).

Les cyanobactéries peuvent aussi avoir un effet direct sur leurs prédateurs ainsi que sur leurs compétiteurs via la synthèse de substances allélopathiques qui ont plusieurs modes d'action allant de l'inhibition de la photosynthèse jusqu'à l'altération de la physiologie de leurs cibles (Leflaive & Ten-Hage 2007). La capacité à synthétiser des toxines semble aussi conférer un avantage compétitif aux cyanobactéries. En plus de leur effet toxique (Van Apeldoorn et al. 2007) et de leur potentiel à modifier la composition du zooplancton (Hansson et al. 2007), les toxines semblent jouer un rôle dans le maintien et la formation de colonies de *Microcystis* via l'augmentation de production de polysaccharides extracellulaires (Gan et al. 2012).

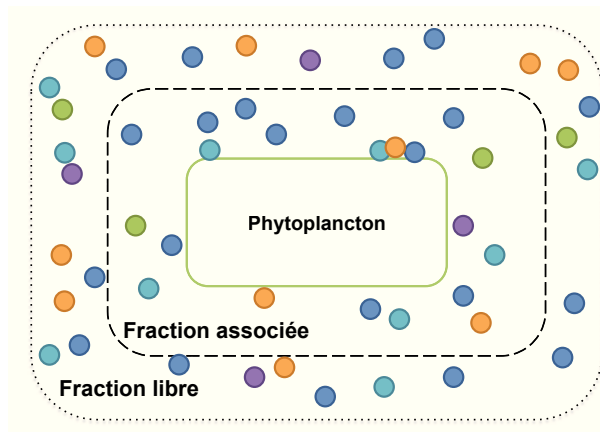


### **3. Interactions entre cyanobactéries et bactéries**

#### **3.1. Concept de la phycosphère**

Dans les écosystèmes terrestres, les interactions entre les organismes photosynthétiques et les bactéries se produisent principalement dans la région entourant les racines des plantes, désignée sous le terme de la rhizosphère. Dans cette région s'établit un gradient d'exsudats qui permet la différenciation de communautés microbiennes distinctes, en augmentant la croissance de certaines microorganismes ou en limitant la croissance d'autres (Philippot et al. 2013). Dans les écosystèmes aquatiques, des interactions similaires ont été proposées au sein de la phycosphère (Bell & Mitchell 1972). Nommée ainsi par analogie à la rhizosphère, la phycosphère désigne donc le microhabitat où les bactéries peuvent interagir avec les producteurs primaires. Le phytoplancton fournirait les exsudats et les débris cellulaires qui soutiennent la croissance des bactéries. Ces dernières régénèrent les nutriments qui sont associés à la matière organique phytoplanctonique (en particulier le N et le P (Azam et al. 1983)) ce qui stimulera en retour la croissance du phytoplancton (Buchan et al. 2014).

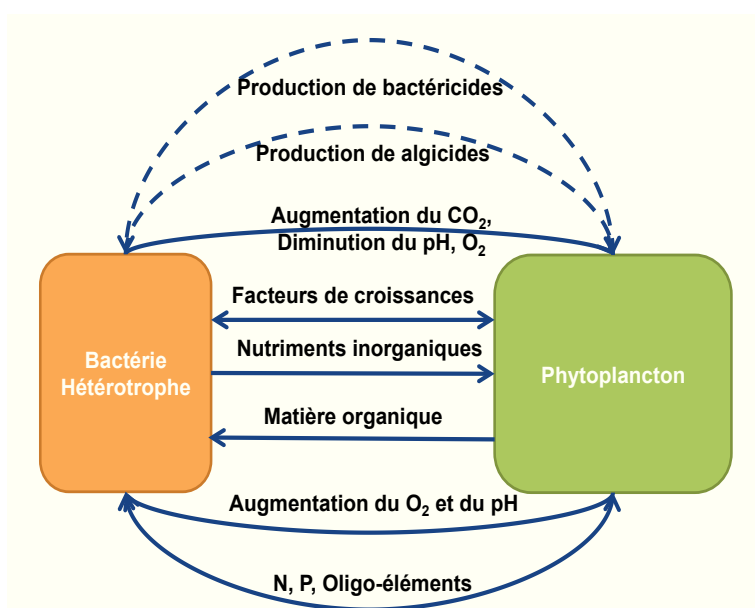
Dans les écosystèmes naturels ou en milieu de culture, cette zone est en fait plus conceptuelle que pourvue d'une véritable réalité physique. En effet, les dimensions physiques de la phycosphère sont transitoires et dépendront de la concentration et du taux d'exsudats relargués, ainsi que du degré de turbulence du milieu (Cole 1982). On distingue alors dans la colonne d'eau deux zones par rapport à la position du phytoplancton, une première zone qui part de la cellule phytoplanctonique vers l'extérieur où les bactéries subissent l'effet direct du phytoplancton, qu'on désignera sous le terme de «Fraction Associée» et une deuxième zone plus éloignée où les bactéries subissent l'effet indirect du phytoplancton qu'on désignera sous le terme de «Fraction Libre» (Figure I. 8.). D'une manière opérationnelle, on distingue ces fractions via des filtrations différentielles.



**Figure I. 8.: Schéma conceptuel illustrant la fraction associée et la fraction libre au sein de la phycosphère.** La fraction associée représente l'ensemble des bactéries (représenté par les ronds de différentes couleurs) localisée à proximité immédiate ou attachées physiquement à la cellule du phytoplancton, subissant son effet direct. La fraction libre représente l'ensemble des bactéries à l'état libre subissant l'effet indirect du phytoplancton.

### 3.2. Phycosphère en milieu marin

Depuis l'apparition de ce concept, la phycosphère a été largement étudiée en milieu marin. Ces études se sont intéressées à identifier la diversité de la phycosphère et à déterminer les interactions entre les bactéries et le phytoplancton eucaryote principalement.



**Figure I. 9.: Schéma conceptuel illustrant l'association phytoplanctons-bactéries hétérotrophes au sein de la phycosphère.** Cette association peut être positive (flèches à traits pleins) ou négative via les bactéricides et les algicides (flèches en pointillées). Au sein de cette association, les bactéries bénéficient de la matière organique produite par le phytoplancton et elles sont soumises à une augmentation des concentrations en  $O_2$  et du pH. En contre partie le phytoplancton associé bénéficie des nutriments inorganiques et de l'augmentation des concentrations en  $CO_2$ . Des facteurs de croissance peuvent être échangés entre les deux communautés associées ainsi que des oligo-éléments et des composés inorganiques.

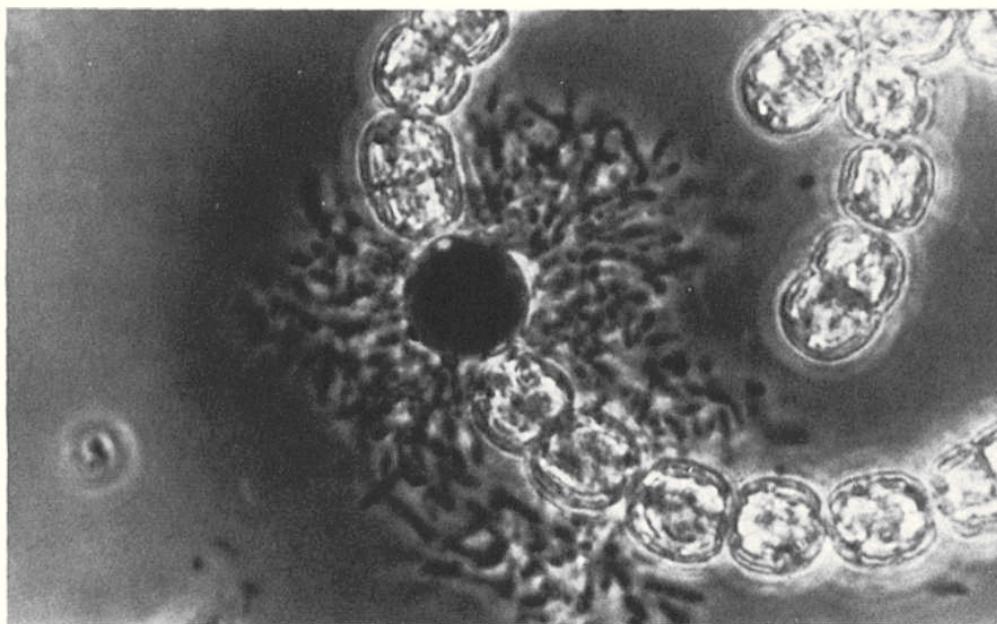
Ces études ont permis de mettre en évidence plusieurs types d'associations (Cole 1982) qui vont du mutualisme (Bell et al. 1974) au parasitisme (Salomon & Imai 2006), traduisant la complexité des interactions qui peuvent exister au sein de la phycosphère (Figure I. 9.).

L'intérêt porté à la phycosphère des phytoplanctons eucaryotes marins résulte du fait que ces associations peuvent jouer un rôle important dans les flux de matière en formant des « Hot-spots » de matière organique dissoute (DOM pour Dissolved Organic Matter) dans les océans oligotrophes (Grossart et al. 2006, Azam & Malfatti 2007).

Ces interactions sont considérées comme étant spécifiques. En effet, la composition de la communauté bactérienne (BCC pour Bacterial Community Composition) associée au phytoplancton est différente de celle de la fraction libre (Grossart et al. 2005). De récentes études ont révélé l'existence de mécanismes d'interaction et de signalement moléculaire entre le phytoplancton et les bactéries qui sont similaires à ceux existants entre les plantes et les bactéries de la rhizosphère. L'étude de Amin et al. (2015) effectuée sur la diatomée *Pseudonitzschia multiseries* et les bactéries qui lui sont associées montre que la sécrétion de tryptophane par la diatomée peut attirer une large gamme de bactéries, mais ne ciblerait que les bactéries qui peuvent convertir le tryptophane en acide indole-3-acétique. La mise en place d'une interaction positive entre la diatomée et ces bactéries se traduit par l'augmentation de leurs biomasses respectives, en plus de l'échange de molécules essentielles tels que l'ammoniac et de composés organiques soufrés. Néanmoins, les communautés bactériennes associées aux proliférations du phytoplancton marin sont peu diverses et un nombre limité de taxa domine toujours ces proliférations (Teeling et al. 2012).

Peu d'études se sont intéressées aux phycosphères de cyanobactéries en milieu marin en comparaison des nombreuses qui traitent du phytoplancton eucaryote. Néanmoins ces études, qui ont souvent ciblées les cyanobactéries fixatrices de N<sub>2</sub>, ont mis en évidence plusieurs résultats intéressants. L'influence des cyanobactéries sur les bactéries (i.e. les bactéries chimiotrophes et phototrophes autre que les cyanobactéries) peut être positive (e.g. comme source de carbone) ou négative (e.g. compétiteurs pour les nutriments) (e.g. Renaud et al. 2005, Brauer et al. 2015). Par ailleurs, Paerl (1978, 1996b) a observé que les bactéries sont préférentiellement

attachées aux hétérocystes (Figure I. 10.) et pourraient donc être potentiellement impliquées dans le maintien de l'anoxie nécessaire à l'activité de la nitrogénase<sup>7</sup>.



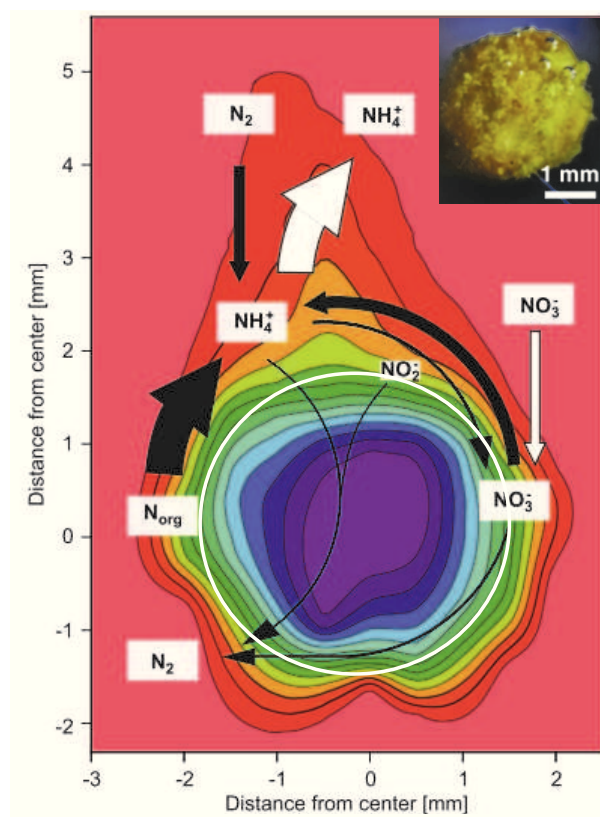
**Figure I. 10.: Photo en microscopie à contraste de phase de filaments d'*Anabaena spiroides* collectées durant une prolifération d'*Anabaena* dans le lac Okaro. L'hétérocyste (cellule sombre) est entouré par des bactéries qui lui sont fixées (Issue de Paerl 1978).**

D'autre part, il a été démontré que la communauté bactérienne associée à la phycosphère de *Nodularia* spp. en mer baltique est différente de celle de la fraction libre (Tuomainen et al. 2006) et qu'elle possède les gènes nécessaires à la nitrification et la dénitrification, même si les activités liées à ces gènes n'ont pu être détectées (Tuomainen et al. 2003). De même, il a été montré que les cyanobactéries fixatrices de  $N_2$  peuvent soutenir la croissance de bactéries hétérotrophes en particulier dans les environnements pauvres en éléments nutritifs (Hietanen et al. 2002a) et que ces bactéries sont fonctionnellement différentes des bactéries de la fraction libre (Hewson et al. 2009). Une partie de l'azote fixé par les cyanobactéries tel que *Trichodesmium*, pourrait potentiellement bénéficier aux bactéries environnantes, en particulier à celles qui sont impliquées dans le recyclage de l'azote (Capone et al. 1994, Glibert & Bronk 1994, Mulholland & Capone 2000, Mulholland et al. 2004). Enfin, les travaux de Ploug (2008) et Ploug et al. (2010, 2011) sur *Aphanizomenon* sp. et *Nodularia* sp. ont suggéré que l'association étroite

---

<sup>7</sup> Nitrogénase : enzyme responsable de la conversion du  $N_2$  en N biodisponible. La réaction produit de l'ammoniac ( $NH_3$ ) qui est biologiquement disponible pour la synthèse d'acides aminés.

entre ces cyanobactéries et les bactéries hétérotrophes crée un micro-environnement de pH avantageux pour l'absorption du fer par les cyanobactéries qui libèrent à leur tour les produits de fixation de  $N_2$  à la communauté hétérotrophe. Ainsi l'association entre des bactéries et des cyanobactéries fixatrices de  $N_2$  pourrait fournir un avantage pour les bactéries hétérotrophes non fixatrices de  $N_2$ . Ces agrégats de filaments de cyanobactéries offriraient un microhabitat permettant aux différentes étapes du recyclage de l'azote de pouvoir s'opérer (Figure I. 11.) (Klawonn et al. 2015).

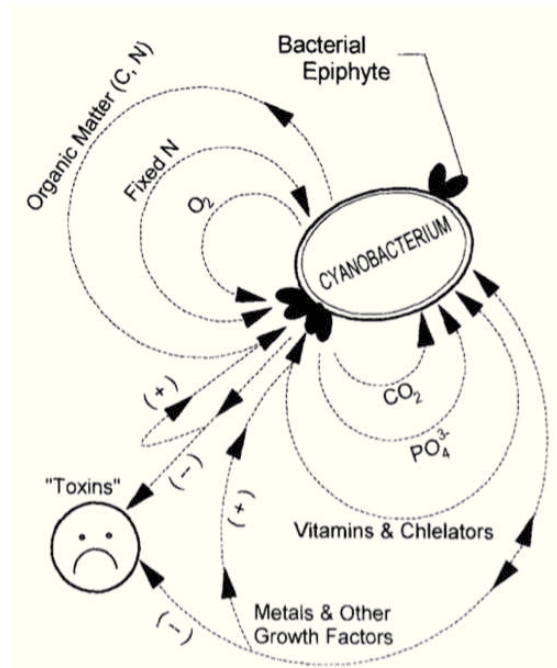


**Figure I. 11.: Représentation schématique des processus de transformation de l'azote qui peuvent potentiellement avoir lieu dans les agrégats de *Nodularia spumigena*** représenté sur l'isoplèthe de  $O_2$  autour et à l'intérieur d'un agrégat dans des conditions d'air saturé en  $O_2$ . La surface de l'agrégat est marquée par un cercle blanc. L'intérieur est anoxique et représente 5% de la surface totale de l'agrégat ce qui permet la coexistence des différentes transformation de l'azote en conditions aérobiques et anaérobiques. La largeur des flèches représente l'importance relative des taux nets mesurés dans des conditions de disponibilité du substrat après incubations de 9h. Les flèches en blanc indiquent le relargage net de  $NH_4^+$  et l'assimilation net de  $NO_3^-$  par les agrégats (adapté de Klawonn et al. 2015).

### 3.3. Phycosphère en milieu lacustre

Les proliférations des cyanobactéries en milieu marin sont différentes de celles des milieux lacustres (Paerl 1996a), en particulier par les niveaux de biomasse générée lors de ces événements, et les caractéristiques très différentes des écosystèmes dulçaquicoles et marins rendent la comparaison de ces phycosphères difficile à établir. Néanmoins, on observe le même type d'interactions que ceux décrit au préalable. En effet, les études effectuées en milieux lacustres montrent que les bactéries interagissent de différentes manières avec les cyanobactéries auxquelles elles sont associées (Figure I. 12.). Elle peuvent agir

positivement sur la croissance des cyanobactéries via la reminéralisation des exsudats (Kirkwood et al. 2006), la dégradation de toxines (Berg et al. 2009, Dziallas & Grossart 2011), la respiration qui augmente les concentrations en  $\text{CO}_2$  ainsi que la production de facteur de croissance telles que les vitamines (Paerl & Pinckney 1996). Ces interactions peuvent aussi être négatives à travers l'inhibition et la lyse des cellules cyanobactériennes par certaines bactéries (Fallon & Brock 1979, Gumbo & Colet 2011) ou inversement la production par certaines cyanobactéries de composés qui inhibent la croissance des bactéries (Cannell et al. 1988).



**Figure I. 12.: Interactions métaboliques potentiellement bénéfiques entre les cyanobactéries et les bactéries hétérotrophes associées.** Les toxine peuvent jouer un rôle antagoniste pour les bactéries, indiqué par (-), ou un rôle bénéfique pour les bactéries associées, indiqué par (+) (Issue de Paerl & Pinckney 1996)

Les communautés bactériennes associées aux cyanobactéries dans les écosystèmes d'eau douce présentent une composition différente de celle des communautés bactériennes libres dans les mêmes écosystèmes (Parveen et al. 2013, Cai et al. 2013). Contrairement au milieu marin, les phycosphères cyanobactériennes des milieux lacustres seraient caractérisées par une grande diversité bactérienne (Kolmonen et al. 2004, Eiler & Bertilsson 2004, Eiler et al. 2006, Pope & Patel 2008, Berg et al. 2009) et par une forte abondance de bactéries hétérotrophes (entre  $10 \times 7$  et  $10 \times 11$  cellules. $\text{L}^{-1}$ ), ce qui suggère un couplage proche entre la production primaire et les bactéries hétérotrophes (Eiler & Bertilsson 2004). En effet, les phycosphères en milieu lacustre sont aussi considérées comme un « Hot-spot » d'activité bactérienne (Worm & Søndergaard 1998, Brunberg 1999) avec des caractéristiques physiologiques qui leur confèrent une activité différente de

celle de la fraction libre, notamment par rapport à leur activité aminopeptidase (Worm & Søndergaard 1998) et leur affinité pour l'arginine (Eiler et al. 2006). De nombreux travaux sur les communautés bactériennes associées aux cyanobactéries dans les milieux lacustres se sont intéressés aux pouvoirs lytiques de certaines bactéries (e.g. Xing et al. 2011) et à la dégradation des cyanotoxines par les bactéries (e.g. Zhu et al. 2014).

Le genre *Microcystis* a bénéficié d'un intérêt particulier dans les travaux qui ciblent la phycosphère des milieux lacustres en raison du fait (i) qu'il est capable de proliférer dans des écosystèmes très différents et à toutes les latitudes, (ii) que ces proliférations sont très souvent toxiques et constituent donc un risque pour l'homme et (iii) que la formation de larges colonies entourées d'une matrice de polysaccharides (écume) offre une niche potentielle pour de nombreuses bactéries chimiotrophes (Worm & Søndergaard 1998, Shen et al. 2011). De plus, d'autres travaux montrent que les proliférations de *Microcystis* pourraient permettre une meilleure survie ou même une croissance de bactéries pathogènes (Berg et al. 2009) et de bactéries fécales (Wilhelm et al. 2011).

#### **4. Hypothèses et objectifs**

Malgré les nombreux travaux produits lors des deux dernières décennies sur les proliférations de cyanobactéries en milieu lacustre, il reste difficile de prédire le début, la durée et l'intensité de ces proliférations dans un écosystème donné. Ceci pourrait être dû en partie à un manque de connaissances sur les interactions existant entre les cyanobactéries et les microorganismes phototrophes et chimiotrophes dans ces écosystèmes.

Il existe en effet encore peu d'informations concernant l'identité et le rôle des communautés bactériennes associées aux cyanobactéries qui interviennent dans ces interactions. De plus, les études qui ciblent la phycosphère cyanobactérienne des milieux lacustres se focalisent souvent sur un genre de cyanobactéries et elles ne prennent donc pas en considération l'hétérogénéité fonctionnelle des différents genres de cyanobactéries alors que celle-ci pourrait jouer un rôle majeur dans la nature des interactions bactéries-cyanobactéries. Par ailleurs, il existe également très peu d'informations sur l'impact que pourrait jouer les variations dans les conditions environnementales sur ces interactions, sachant que les écosystèmes aquatiques continentaux présentent une grande instabilité en comparaison aux grandes masses d'eau océaniques.

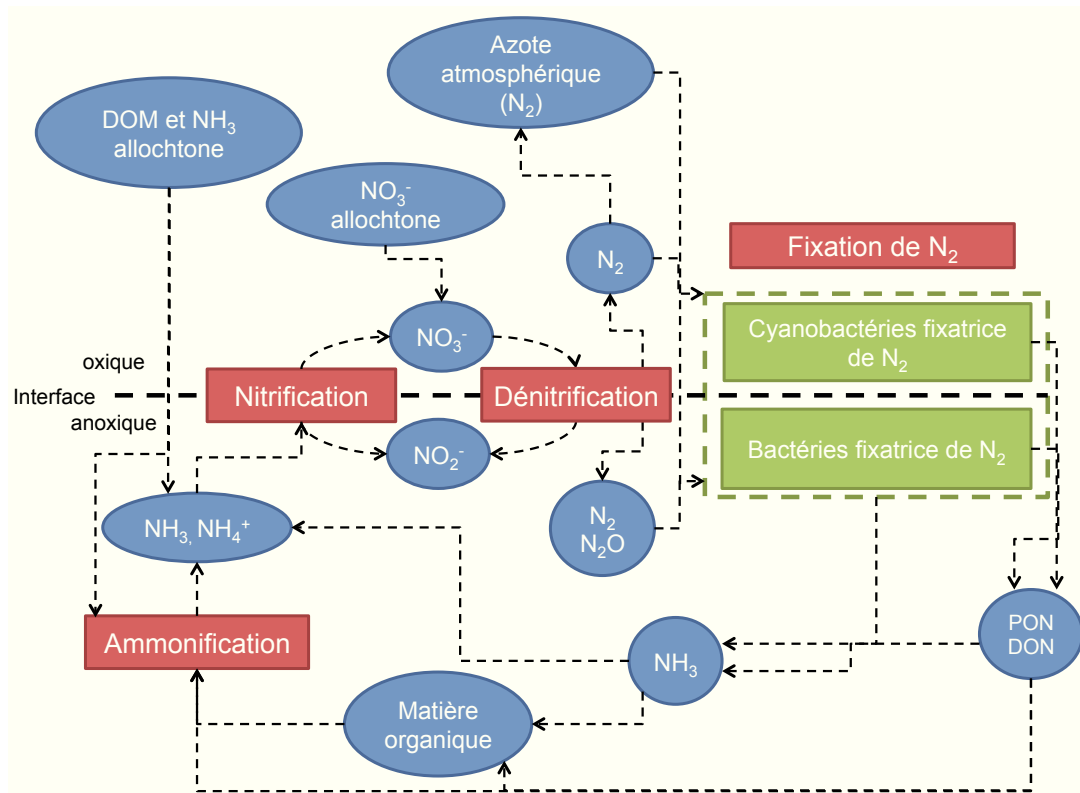
L'hypothèse de base que nous avons retenue est qu'en raison des relations étroites existant potentiellement entre les cyanobactéries et les bactéries qui leur sont associées, principalement en termes d'échanges de nutriments et de facteurs de croissance, la composition des communautés bactériennes associées aux cyanobactéries diffère de celle des communautés non associées. Par ailleurs, nous postulons également que les stratégies écologiques des différents genres de cyanobactéries (organisation en cellules isolées ou en filaments ou en colonies, fixation du  $N_2$  ... ) offriraient des « niches écologiques »<sup>8</sup> différentes aux bactéries qui leur sont associées, ce qui conduirait à la sélection de communautés bactériennes différentes dans les fractions associées. Notre première question a donc été de déterminer si la diversité structurelle des communautés bactériennes associées aux cyanobactéries était différente (i) de celle des communautés bactériennes non associées et (ii) selon le genre de cyanobactérie considéré.

Dans un second temps, nous nous sommes intéressé à la signification fonctionnelle de cette diversité. L'hypothèse que nous faisons était qu'en raison de probables échanges de nutriments entre les cyanobactéries et les bactéries qui leur sont associées, les capacités métaboliques de ces communautés bactériennes associées ainsi que la distribution de certains groupes fonctionnels responsable du recyclage de nutriments pouvaient différer selon le genre de cyanobactéries considéré. Nous avons alors comparé les capacités métaboliques des communautés bactériennes associées à différentes cyanobactéries. De plus, nous avons porté un focus particulier sur le cycle de l'azote en raison des capacités différentes des cyanobactéries à fixer ou non l'azote atmosphérique et de leurs conséquences potentielles sur l'ensemble du cycle de l'azote (Figure I. 13.).

---

<sup>8</sup> La niche écologique d'une espèce désigne non seulement le type de place qu'occupent dans le milieu les individus de cette espèce, mais aussi les multiples relations qu'ils ont avec le reste de l'écosystème





**Figure I. 13.: Représentation schématique des différentes étapes de transfert (sens des flèches) de composés azotés (en bleu) via les différentes transformations biologiques (en rouge) à l'interface de la zone oxiqne et anoxiqne dans les écosystèmes aquatiques. (D'après Paerl & Pinckney 1996)**

Sachant que lors des proliférations de cyanobactéries, les concentrations en oxygène dissout dans l'eau subissent des variations considérables à la fois dans l'espace (au sein et hors des agrégats de matière organique ou de cyanobactéries) et dans le temps (jour/nuit), ces événements de proliférations pourraient offrir les conditions environnementales permettant de réaliser la totalité du recyclage d'azote dans les écosystèmes lacustres. Par ailleurs, comme les cyanobactéries sont capables ou non de fixer l'azote atmosphérique, il est intéressant de comparer la distribution des groupes fonctionnels impliqués dans le cycle de l'azote au sein des communautés bactériennes associées et non associées à ces cyanobactéries fixatrices (*Anabaena*) et non fixatrices (*Microcystis*) d'azote au sein d'un même écosystème.

## 5. Approches utilisées

Nos travaux ont reposé sur deux approches distinctes, l'une menée sur des cyanobactéries cultivées et l'autre menée en milieu naturel.

Les études réalisées sur des cultures de cyanobactéries nous permettent de nous affranchir des impacts directs ou indirects que peuvent avoir les conditions environnementales sur les communautés bactériennes et de comparer des communautés bactériennes associées à diverses cyanobactéries cultivées dans les mêmes conditions. Cette approche nous a permis de prendre en considération plusieurs processus qui pourraient agir sur la composition et les capacités métaboliques des bactéries associées aux cyanobactéries. Nous avons en effet comparé les communautés bactériennes associées à des cyanobactéries fixatrices ou non de N<sub>2</sub>, présentant différentes organisations cellulaires (en cellules isolées, en filament ou en colonies) et isolées en différents lieux depuis un temps plus ou moins long.

La deuxième approche effectuée en milieu naturel nous a permis d'étudier la diversité structurelle et fonctionnelle des bactéries associées à la succession d'une prolifération de cyanobactérie fixatrice (*Anabaena*) et non fixatrice de N<sub>2</sub> (*Microcystis*) au sein d'un même écosystème et durant une même saison estivale. Cette succession devait nous permettre de comparer l'évolution des communautés bactériennes associées à ces deux espèces de cyanobactéries présentant des capacités fonctionnelles différentes au sein d'un même environnement.

## **6. Organisation du manuscrit**

Le manuscrit s'organise en trois autres chapitres faisant suite au **premier chapitre d'introduction**.

**Le deuxième chapitre** apporte des éléments de réponse aux hypothèses suivantes :

- (i) Au sein d'un même écosystème, les communautés bactériennes associées aux cyanobactéries présentent une diversité structurelle différente de celles qui ne se trouvent pas sous l'influence directe des cyanobactéries
- (ii) En raison de la capacité de certaines cyanobactéries à fixer l'azote atmosphérique mais aussi de différences dans l'organisation cellulaire et dans d'autres caractères, les communautés bactériennes associées à différents genres de cyanobactéries présentent des différences structurelles et fonctionnelles

Le contenu de ce chapitre fait l'objet de deux articles :

Article 1 : Structural diversity of bacterial communities associated with bloom-forming freshwater cyanobacteria differs according to the cyanobacterial genus (en Revision pour Plos One).

Article 2 : Bacterial communities associated with four cyanobacterial genera display differences in their structural and functional diversities: Evidence from an experimental approach (En Revision pour Environmental Microbiology).

**Le troisième chapitre** apporte des réponses aux hypothèses suivantes :

- (i) L'abondance et la diversité des groupes fonctionnels de bactéries impliquées dans le cycle de l'azote présentent des différences dans les communautés bactériennes associées aux cyanobactéries et dans celles qui ne subissent qu'une influence indirecte.
- (ii) La distribution de ces groupes fonctionnels dans les communautés bactériennes associées aux cyanobactéries est différente selon la capacité ou non de ces cyanobactéries à fixer le N<sub>2</sub>

Le contenu de ce chapitre fait l'objet d'un article :

Article 3 : Distribution of nitrogen cycling communities within different bloom forming cyanobacterial genera phycosphere (Draft d'article pour soumission dans Environmental Microbiology Report)

Enfin, **dans le dernier chapitre**, une analyse critique des principaux résultats est réalisée et des pistes de futures recherches sont présentées.





## **II. DIVERSITE ET CAPACITES METABOLIQUES DES PHYCOSPHERES CYANOBACTERIENNES**

---



## 1. Introduction

### 1.1. Approche en milieu naturel

L'étude des communautés bactériennes via leur ADN directement extrait de l'environnement est une approche désormais très courante en écologie microbienne (Amann et al. 1995). L'ADN environnemental extrait peut être exploité via l'amplification par PCR de gènes sélectionnés pour leur intérêt en analyse taxonomique (e.g. gène de l'ARNr 16S) ou pour des fonctions écologiques particulières (par exemple les gènes *nif* pour la fixation du N<sub>2</sub>). Jusque dans les années 2000, les fragments amplifiés étaient clonés avant séquençage avant que les nouvelles technologies de séquençage (NGS pour Next Generation Sequencing) permettent de les séquencer directement (Zinger et al. 2012). Si le nombre de clones séquencés était souvent relativement limité par échantillon (au maximum, quelques centaines), les NGS permettent désormais d'obtenir des profondeurs de séquençage beaucoup plus importantes (plusieurs milliers de séquences par échantillon). Le pyroséquençage 454 sur amplicons (voir Annexe 1 pour le détail de la technique) permet donc de caractériser la diversité des communautés aquatiques procaryotes de façon plus exhaustive et facilite la détection des taxa à faible abondance (MacLean et al. 2009).

L'utilisation du gène de l'ARNr 16S est classique en écologie microbienne (Amann & Ludwig 2000). En effet, ce gène ubiquitaire possède une structure en mosaïque, composée de régions conservées et de régions variables (de V1 à V9), ces dernières permettant de réaliser une identification taxonomique au niveau des bactéries présentes au sein des communautés. Le gène codant l'ARNr 16S a également la particularité de ne pas être soumis au transfert latéral de matériel génétique entre microorganismes ce qui en fait un bon marqueur génétique pour la détermination de la composition des communautés bactériennes.

Le choix de la région à séquencer dans le gène codant l'ARNr 16S et donc du couple d'amorces à utiliser pour la PCR est important (e.g. Claesson et al. 2010). La capacité offerte par le pyroséquençage d'obtenir une grande profondeur de séquençage est d'autant plus intéressante dans notre cas d'étude car lors des proliférations de cyanobactéries, ces dernières sont présentes en très grande abondance et leur ADN est donc dominant après extraction. C'est pourquoi seules deux études utilisant le pyroséquençage 454 d'amplicons d'ARNr 16S sur des communautés bactériennes associées à des cyanobactéries en culture (Bagatini et



al. 2014) et en milieu naturel (Cai et al. 2014) ont été publiées à ce jour. Il est souligné que la dominance des cyanobactéries rendait difficile la description des communautés bactériennes qui leur sont associées.

Pour limiter le nombre de séquences de cyanobactéries, Hodkinson & Lutzoni (2010) ont identifié un couple d'amorce ciblant la région V6 - V8 de l'ARNr 16S bactérien tout en excluant les cyanobactéries dans une étude qui s'est intéressait aux associations entre les lichens et les bactéries. A notre connaissance, ces amorces n'ont pas été utilisées pour étudier des communautés bactériennes lors de proliférations de cyanobactéries. C'est pourquoi nous avons dans un premier temps testé, par une analyse *in silico* la spécificité de ces amorces (c'est à dire leur capacité à amplifier tous les groupes bactériens à l'exception des cyanobactéries ; voir Annexe 2 pour les résultats), puis dans un second temps, utilisé ces amorces sur des échantillons naturels récoltés lors de proliférations de cyanobactéries, en comparant les résultats obtenus sur les communautés bactériennes à ceux résultant de l'utilisation d'amorces génériques n'excluant pas les cyanobactéries.

Une autre limite des connaissances disponibles sur les communautés bactériennes associées aux cyanobactéries et notamment sur la spécificité ou non de ces communautés en fonction du genre de cyanobactéries auxquelles elles sont associées, est lié au fait que la comparaison de ces communautés a été réalisée à partir d'échantillons issus de différents lacs (voir par exemple la publication de Eiler & Bertilsson, 2004). Or il a été montré dans de nombreux travaux que les facteurs environnementaux locaux (propres à chaque plan d'eau) ont un impact significatif sur la composition des communautés bactériennes de ces lacs (e.g. Humbert et al. 2009). Il est donc difficile de différencier l'importance relative des conditions environnementales et de l'espèce de cyanobactéries sur les communautés bactériennes qui leur sont associées.

C'est pourquoi, dans le cadre de ce projet de thèse, nous avons choisi de travailler sur un plan d'eau d'une base de loisirs localisée à Champs-sur-Marne (Île-de-France) et faisant l'objet d'un suivi par l'équipe Molécules de Communication et Adaptation des Microorganismes (UMR 7245) du Muséum National d'Histoires Naturel de Paris (MNHN). En effet, ce plan d'eau connaît depuis 2005 des épisodes réguliers de proliférations de cyanobactéries avec des successions et/ou coexistences de différents genres de cyanobactéries. Lors de notre échantillonnage en 2012, deux genres de cyanobactéries ont proliféré successivement pendant l'été.

Les échantillons d'eau ont été recueillis durant ces proliférations pendant trois jours consécutifs en juillet (prolifération d'*Anabaena* sp.) et pendant trois jours consécutifs en septembre (prolifération de *Microcystis* sp.). Chaque jour, les échantillons d'eau ont été filtrés de façon différentielle pour séparer les bactéries de la fraction libre de ceux de la fraction associée aux cyanobactéries. Ces échantillons ont été utilisés pour comparer la diversité structurelle des communautés bactériennes associées aux deux genres de cyanobactéries présent, *Anabaena* (cyanobactérie filamenteuse fixatrice de N<sub>2</sub>) et *Microcystis* (cyanobactérie coloniale non fixatrice de N<sub>2</sub>).

Tous ces travaux ont fait l'objet de l'article présenté dans la section II.2.

### **1.2. Approche en milieu de culture**

En complément de nos travaux sur les milieux naturels, nous avons comparé les communautés bactériennes associées à différentes souches de cyanobactéries maintenues en culture depuis plus ou moins longtemps (de 2 à 12 ans) et présentant des organisations cellulaires (filaments, colonies, cellules isolées) et des capacités physiologiques (fixation ou non d'azote) variées.

Nos objectifs principaux étaient (i) d'identifier les principaux facteurs ayant un impact sur la composition des communautés bactériennes associées aux cyanobactéries (organisation cellulaire, origine, capacité à fixer le N<sub>2</sub>), (ii) de déterminer si la richesse et la diversité des communautés bactériennes est maintenue dans les cultures de cyanobactéries et (iii) de comparer ces communautés avec celles que l'on observe en milieu naturel.

Grâce aux souches obtenues de la «Collections de cyanobactéries vivantes» (PMC) du MNHN, nous avons pu travailler sur 15 souches appartenant à quatre genres de cyanobactéries différents : *Aphanizomenon*, *Anabaena*, *Planktothrix* et *Microcystis*. En plus de la caractérisation de leur diversité structurelle via l'utilisation du pyroséquençage 454 sur un amplicon de l'ARNr 16S, l'approche en milieu de culture nous permettrait également d'évaluer les capacités métaboliques potentielles de ces communautés bactériennes à utiliser différentes sources de carbone grâce à l'utilisation du système Biolog EcoPlates™.

Les plaques Biolog constituent un bon outil de discriminations du potentiel fonctionnel des communautés bactériennes (Choi & Dobbs 1999), et elles ont déjà fourni des informations utiles sur la diversité fonctionnelle des communautés bactériennes associées à des proliférations de phytoplancton lacustre (Worm et al. 2001) ou encore à des proliférations de *Microcystis* (Kapustina 2006).

Ces travaux ont fait l'objet de l'article présenté dans la section II.3.

### **1.3. Méthodologie**

#### **1.3.1. Analyse des données de diversité structurale**

Le traitement des données générées par les techniques de séquençages à haut débit telles que le pyroséquençage nécessite le développement et l'utilisation d'outils de bioinformatique adaptés. Plusieurs pipelines de traitements de séquences sont actuellement disponibles. Dans le cadre de nos collaborations avec l'équipe de D. Debroas (équipe Microbiologie de l'Environnement du Laboratoire Microorganismes: Génome et Environnement, UMR CNRS 6023, Clermont-Ferrand) nous avons utilisé l'outil «Phylogenetic Analysis of Next Generation Amplicons» (PANAM) développé par ce laboratoire (Taib et al. 2013). Les outils implémentés dans PANAM nous permettent de traiter les séquences brutes, de définir les Unités Taxonomiques Opérationnelles (OTUs pour Operational Taxonomic Units) puis de comparer les séquences de ces OTUs à celles d'une base de référence<sup>9</sup>.

Plus précisément, le traitement commence par une étape indispensable de nettoyage des séquences. En effet, Gomez-Alvarez et al. (2009) ont montré que l'utilisation du pyroséquençage 454 produit de nombreuses erreurs de séquençage qui conduisent à une surestimation de l'abondance des taxa, 11% à 35% des séquences étant des artéfacts<sup>10</sup>. De ce fait, seules les séquences (i) d'une longueur minimum de 200 pb, (ii) dont le score de qualité était supérieur à 23, (iii) dont l'amorce F était retrouvée à 100%, et (iv) sans base indéterminée «n», ont été retenues. De même, les homopolymères<sup>11</sup> qui sont des erreurs récurrentes au pyroséquençage 454 (Gomez-Alvarez et al. 2009) ont été éliminés. Enfin, la détection et l'élimination de séquences chimériques putatives a été réalisée en utilisant Uchime (Edgar et al. 2011).

Les séquences nettoyées sont ensuite clusterisées en utilisant Uclust (Edgar 2010). Le seuil de clusterisation de 98% et a été choisi sur la base des données bibliographiques (Stackebrandt & Goebel 1994). Les OTUs générées sont ensuite comparées à la base de référence puis triées par groupe monophylétique en utilisant Usearch (Edgar 2010). Enfin, ces alignements sont utilisés pour construire les

---

<sup>9</sup> Cette base de référence contient la base SSURef 108 de SILVA (Pruesse et al. 2007, Quast et al. 2013) en plus de séquences définies obtenu suite aux des études en milieu d'eau douce.

<sup>10</sup> Séquences chimères et erreurs de séquençage.

<sup>11</sup> Les homopolymères sont des séquences de bases identiques (sept ou plus), e.g AAAAAAA.

phylogénies à l'aide de FastTree (Price et al. 2010) à partir desquelles la taxonomie de chaque OTU a été déterminée. La méthode phylogénétique proposée par PANAM replacent les séquences dans un contexte évolutif et leur attribuent une taxonomie dont la précision dépend de la position par rapport aux séquences voisines.

### **1.3.2. Analyse des données de diversité fonctionnelle**

L'utilisation des EcoPlates permet d'évaluer les capacités des communautés bactériennes à utiliser 31 sources différentes de carbone. Ces substrats carbonés appartiennent à cinq grandes familles à savoir: (1) les hydrates de carbone; (2) des acides carboxyliques et acétiques; (3) les acides aminés; (4) les polymères; et (5) les amines et les amides (voir détail dans Annexe 3). La réduction du Tétrazolium utilisé dans chaque puits indique que les communautés bactériennes utilisent le substrat du puits. Les puits « positifs » développent une couleur pourpre qui peut être quantifiée par spectrophotométrie. Sur une plaque, les 31 sources de carbone sont répliquées trois fois auquel s'ajoutent trois puits témoins avec de l'eau.

Dans chaque puits, 150 µl de chaque échantillon de culture est déposé. L'incubation est menée durant une semaine à 25°C et la densité optique a été mesurée dans les puits tous les jours à une longueur d'onde de 590 nm. La moyenne entre les répétitions techniques et entre triplicats de cultures est utilisée pour le calcul des indices suivant:

- (i) Pour chaque communauté bactérienne associée aux différentes souches de cyanobactéries, l'activité microbienne peut être exprimée par le calcul de l'indice « AWCD » (the average well-color development) déterminé comme suit:  $AWCD = \sum ODi / 31$ , où  $ODi$  est la valeur de densité optique moyenne de chaque puits.
- (ii) «Carbon metabolic richness» est le nombre de substrats de carbone oxydés. Cet indice a été calculée en utilisant une OD de 0,25 comme seuil pour une réponse positive (Garland 1996).
- (iii) L'indice de la consommation d'azote est le rapport de l'utilisation totale de substrat à des substrats qui contiennent de l'azote (Sala et al. 2006).



## 2. Diversité structurelle des phycosphères cyanobactériennes dans les milieux lacustres

### **Structural diversity of bacterial communities associated with bloom-forming freshwater cyanobacteria differs according to the cyanobacterial genus**

Imen Louati<sup>1</sup>, Noémie Pascault<sup>1</sup>, Didier Debroas<sup>2</sup>, Cécile Bernard<sup>3</sup>, Jean-François Humbert<sup>1</sup> and Julie Leloup<sup>1</sup>

<sup>1</sup>IEES - PARIS, UMR 7618 (UPMC – CNRS – INRA – IRD – UPEC – Paris Diderot), UPMC, Paris, France

<sup>2</sup>Laboratoire Microorganismes: Génome et Environnement, UMR CNRS 6023, Clermont Université Blaise Pascal, Aubière, France

<sup>3</sup> MCAM MNHN, UMR CNRS 7245, Muséum National d'Histoire Naturelle, Sorbonne Universités, Paris, France

#### **Abstract:**

The factors and processes driving cyanobacterial blooms in eutrophic freshwater ecosystems have been extensively studied in the past decade. A growing number of these studies concern the direct or indirect interactions between cyanobacteria and heterotrophic bacteria. The presence of bacteria that are directly associated or immediately adjacent to cyanobacterial cells suggests that intense nutrient exchanges occur between these microorganisms. In order to determine if there is a specific association between cyanobacteria and bacteria, we compared the bacterial community composition during two cyanobacteria blooms of *Anabaena* (filamentous and N<sub>2</sub>-fixing) and *Microcystis* (colonial and non-N<sub>2</sub> fixing) that occurred successively within the same lake. Using high-throughput sequencing, we revealed a clear distinction between associated and free-living communities and between cyanobacterial genera. The interactions between cyanobacteria and bacteria appeared to be based on dissolved organic matter degradation and on N recycling, both for N<sub>2</sub>-fixing and non N<sub>2</sub>-fixing cyanobacteria. Thus, the genus and potentially the species, of cyanobacteria and its metabolic capacities appeared to select for the bacterial community in the phycosphere.

## Introduction

The global incidence and severity of cyanobacterial blooms have expanded during the past decades due to the eutrophication of many freshwater ecosystems and to climate warming (Paerl & Huisman 2008). Despite the increasing body of literature available on this phenomenon, it remains difficult to predict the onset, duration and intensity of blooms in a given ecosystem. This is in part due to a lack of knowledge concerning the processes leading to the dominance of cyanobacteria among the microbial primary producers and on the interactions between phototrophic and chemotrophic microorganisms (Paerl et al. 2000). Under certain environmental conditions cyanobacteria outcompete other phytoplanktonic microorganisms due to their high adaptive capacities for nutrient and light harvesting and their cellular organization in colonies or filaments (Carey et al. 2012). In parallel to these traits the interactions between cyanobacteria and other bacteria have also been highlighted as a potential mechanism inferring a competitive advantage. The lower growth of axenic *Microcystis* cultures as compared to non-axenic cultures (Shen et al. 2011) and the increase in nitrogen fixing (N<sub>2</sub>) capacities and growth in *Anabaena spp.* after addition of bacteria in cultures (Paerl 1978) suggested that these interactions might be important for cyanobacterial fitness.

As the presence of bacteria in cultures might have positive or negative effects on cyanobacterial growth (e.g. Hee-jin et al. 2005, Jiang et al. 2007, Berg et al. 2009) an in-depth description of the associated bacterial communities (i.e. phototrophic and chemotrophic bacteria other than the cyanobacteria) might permit a better understanding of the dynamics of cyanobacterial populations. Indeed, during cyanobacterial blooms bacterial cells can be directly associated to cyanobacterial cells (e.g. Paerl 1978, Gumbo & Colet 2011, Cai et al. 2013) or can be associated in the surrounding area (e.g. Parveen et al. 2013a). In order to determine which bacterial species are found in the cyanobacterial phycosphere, i.e. the microhabitat where bacteria could be attracted by cyanobacteria (see Bell & Mitchell 1972) the bacterial community (BC) has been examined during *Microcystis* blooms (e.g. Shi et al. 2009, Shen et al. 2011, Li et al. 2012, Parveen et al. 2013a). These studies have suggested that the BC in the *Microcystis* phycosphere differed from free-living BCs in the same lake. Moreover, cyanobacterial species with different cellular organization (filament *versus* colony) could offer different microhabitats for bacteria (Yamamoto & Nakahara 2009) and the capacity of some cyanobacteria to fix N<sub>2</sub> could also

potentially influence the associated bacterial communities. For example, Hietanen et al. (2002a) have shown that N<sub>2</sub>-fixing cyanobacteria supported heterotrophic growth particularly in nutrient deficient environments. Ploug (2008) and Ploug et al. (2010) suggested (i) that the close association between cyanobacteria and heterotrophic organisms created a pH microenvironment that was advantageous for cyanobacterial iron uptake which in turn released fixed N compounds to the heterotrophic community, and (ii) that living on N<sub>2</sub>-fixing organisms could provide an advantage for non N<sub>2</sub>-fixing heterotrophic bacteria. From this work, it appears that the metabolic capacities of cyanobacteria might influence the associated bacterial community. However, one of the main limitations is the difficulty to separate the respective impact of the inherent bacterial diversity of the different lakes and that of the cyanobacterial bloom on the composition of the bacterial communities.

In order to assess the impact of the cyanobacteria bloom on one hand and the impact of the cyanobacterial genera on the other the BCs associated with two cyanobacterial blooms (*Anabaena* sp. and *Microcystis* sp.) that occurred successively within the same aquatic ecosystem were compared. This was also compared with the free-living BCs growing in the lake at the same time. A 454-pyrosequencing approach was performed on 16S rRNA amplicons using a combination of two different primer sets in order to minimize the proportions of cyanobacterial 16S rRNA sequences that overwhelmed the detection of other bacterial sequences as has been previously shown (e.g. Cai et al. 2013, Bagatini et al. 2014).

## **Materials and Methods**

### **Study sites, sampling and fraction separation**

The sampling site is a recreational lake located near the city of Champs-sur-Marne (Seine-et-Marne, Île-de-France, France, 48°51'47.0 N, 02°35'53.9 E). The lake has a surface area of 10.3 ha and an average depth of 2.70 m, and since 2005, has had several episodes of cyanobacterial blooms. This lake sampled is not a protected area and it's not located in a national park or connected with protection of wildlife. This study did not involve endangered or protected species. All necessary permits were obtained to access this sampled lake.

In 2012, two distinct cyanobacterial genera bloomed during summer. Water samples (>5 L) were collected during three consecutive days in July (bloom of



*Anabaena*) and during three consecutive days in September (bloom of *Microcystis*). Each day, the water sample was filtered differentially to separate the free-living bacteria (ABF for *Anabaena* Bloom Free and MBF for *Microcystis* Bloom Free) and the cyanobacteria-associated bacteria (ABA for *Anabaena* Bloom Associated and MBA for *Microcystis* Bloom Associated) fractions.

For *Anabaena* sp., water samples were first filtered through a 20µm phytoplankton net in order to remove large detrital material and small eukaryotes that were very abundant in the samples. Then, 50 ml of filtrate containing a high density of *Anabaena* filaments were filtered through a 1.2 µm polycarbonate filter (Isopore Membrane Millipore) in order to concentrate ABA. The filtrate was then passed through a 0.2 µm polycarbonate filter (Nuclepore Polycarbonate Whatman) in order to concentrate the ABF. For *Microcystis* sp., water samples were also filtered through a 20 µm phytoplankton net, but due to the large size of the *Microcystis* colonies the concentrated material on the net was directly transferred to a cryotube for MBA. The remaining filtrate was then passed through a 0.2 µm polycarbonate filter (Nuclepore Polycarbonate Whatman) in order to concentrate the MBF. Samples were directly frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C until DNA extraction.

### **DNA extraction**

DNA was extracted following the procedure of Massana et al. (1997) with some modifications. Briefly, each filter was flash-frozen in liquid nitrogen, and then transferred in Lysing Matrix E (MP Biomedicals, Illkirch, France) with 1.1 ml of lysis buffer (40mM EDTA, 50mM Tris-HCl, 0.75 M sucrose). Bead-beating was applied for 3x30 sec at a speed of 6.5 m s<sup>-1</sup> (FastPrep®-24, MP Biomedicals, France). Then, Lysozyme (0.6 mg ml<sup>-1</sup>) was added to the filters and incubated at 37°C for 45 min with gentle stirring. Subsequently, sodium dodecyl sulfate (1% final concentration) and proteinase K (Thermo Scientific, France) were added, and incubated at 55°C for at least 90 min. Filter-debris were pelletized by centrifugation at 14 000 g for 5 min and supernatants were collected and purified twice by phenol-chloroform-isoamyl alcohol. After precipitation with sodium acetate (0.1 vol) and cold isopropanol (0.6 vol), the nucleic acids were washed with 70% ethanol, and then re-suspended in 100 µL milliQ water. The DNA was stored at -20°C until analysis.

### **Pyrosequencing**

The structure of BCs was assessed by pyrosequencing on gene coding for 16S rRNA. Two primer sets were used to amplify different variable regions on the

16S rRNA fragment. The first primer set, namely 563F (Claesson et al. 2010) and 907rM (Schauer et al. 2003), was used to amplify V4 regions of the major part of bacterial 16S rRNA fragments (including cyanobacteria). This primer set was named Eub-Pr1 for Eubacteria primer-set. The second primer set, namely 895F (Hodkinson & Lutzoni 2010) and 1492R (Lane 1991) was used to amplify the V6-V8 region across the bacteria excluding chloroplast and cyanobacterial sequences of the 16S rRNA fragment. This primer set was named NC-Pr2 for Non-Cyanobacteria primer set. *In silico* analyses against SILVA SSU Ref 108 NR database (Quast et al. 2013) confirmed that most of the cyanobacterial 16S rDNA sequences were excluded by NC-Pr2 and that some non-cyanobacterial sequences could be omitted (data not shown).

Ten base pair tags at 5' position were added to primers to specifically identify each sample (given by Roche) together with adaptors: A Adaptor – TAGx – 563F/895F and 907rM/1492R–B Adaptor. For each sample, three replicated PCR reactions (50 µl) were performed using the Phire Hot Start II DNA Polymerase (Fisher, France), with different optimized conditions. For the Eub-Pr1, the conditions are a first step of denaturation at 98°C for 3 min; 25 cycles of 94°C for 50 s, 52°C for 30 s and 72°C for 30 s; followed by 5 min at 72°C. For the primer set NC-Pr2, a touchdown round (without TAG) was preconized: 98°C for 3 min; 24 cycles of 98°C for 30 s, 65 to 55°C for 30 s with -0.4°C/cycle, 72°C for 60 s; followed by 12 cycles at 55°C and a final extension of 10 min at 72°C. A second round PCR was used to insert the TAG-primers within the sequences at an annealing temperature of 55°C.

The triplicate PCR products were pooled and purified using MinElute Gel Extraction Kit (Qiagen, Valencia, CA) following the manufacturer's protocol and quantified using Qubit dsDNA HS Assay Kits (Invitrogen, France) following the manufacturer's protocol. Pyrosequencing was carried out on 20 ng of amplicons per sample using a Roche 454 GS-FLX system (Titanium Chemistry) by GATC (Konstanz, Germany). A total of 24 PCR samples were pyrosequenced with 12 PCR samples per primer sets (6 for each bloom with 3 replicate per fraction). Only 22 samples were successfully sequenced on a half-plate run (1/4 run per primers set). Indeed, the same one replicate obtained for the *Anabaena* bloom failed in pyrosequencing making a total of 3 replicates for all samples except for ABA where two replicates were obtained for both primer sets.

### **Clustering, alignment and phylogenetic of 16S rRNA gene fragments**

A total of 180 876 reads (Eub-Pr1 primer set) and 276 806 reads (NC-Pr2 primer set) were obtained. The whole reads were analyzed with PANAM software: a tool for the Phylogenetic Analysis and Taxonomic Affiliation of SSU rRNA Amplicons (<https://code.google.com/p/panam-phylogenetic-annotation/>) (Taib et al. 2013). All of these sequences were checked against the following quality criteria: (i) no Ns, (ii) quality score  $\geq 23$  according to the PANGEA process (Giongo et al. 2010), (iii) a minimum sequence length of 200 bp and (iv) no sequencing error in the forward primer. The putative chimeras (UCHIME; (Edgar et al. 2011)) and homopolymers (Meneghin 2011) were detected. Secondly, the reads were de-multiplexed according to TAGx sequences in order to recover reads for each sample. Subsequently, reads were clustered in OTU (Operational Taxonomic Unit) with UCLUST (Edgar 2010) at a cut-off of 98% similarity. Then the OTUs were processed with USEARCH to obtain experimental reads sorted into different phyletic groups. Ad hoc profile alignments (*HMMER*, (Eddy 1998)) were processed prior building of maximum-likelihood phylogenetic trees (*FastTree*, (Price et al. 2010)). Based on these trees an accurate taxonomy was assessed for each OTU. The reads assigned to cyanobacteria were removed from the data. Thresholds for abundant OTUs were defined with an abundance of reads  $> 1\%$  within a sample (Pedrós-Alió 2006).

In parallel, a BLAST analysis was performed on the representative sequences of abundant OTUs ( $> 1\%$  in NC-Pr2 data). Sequences sharing at least a 98% sequence identity with the ones in Genbank® were selected in order to determine their representativeness in this database and the ecosystems they were retrieved from.

### **Statistical analyses**

All the statistical analyses were performed using R software (R Development Core Team 2014). Normalization of sample size (number of reads per sample) was achieved by randomly resampling the same number of reads for each sample based on the smallest sample size.

Diversity indices were calculated on the normalized samples with “fossil” package (Vavrek 2011) for Chao1 and ACE indexes and “vegan” package (Dixon 2003) for Shannon index. Differences in the diversity indices were determined by an Analysis of Variance (ANOVA). The average and standard deviations of these indices were then calculated for each bloom and fraction. The Venn diagram was

constructed using the “VennDiagram” package (Chen & Boutros 2011) on three randomized and averaged selections at each time.

Differences in BCs composition between samples were statistically analyzed as following. A Correspondence analysis using the “ade4TkGUI” package (Thioulouse & Dray 2007) was performed to explore the relationship between bacterial OTUs obtained for each primer set used. Using the “vegan” package, a Mantel-test was performed to compare the Bray-Curtis-transformed OTUs distribution matrices obtained with Eub-Pr1 to that obtained with NC-Pr2.

Permutational Multivariate Analysis of Variance (PERMANOVA), carried out with the “vegan” package using Bray-Curtis distances matrices and 9999 permutations was used to analyze differences between BC at the OTUs level. Kruskal-Wallis tests were used with Bonferroni correction to compare the distribution of phylum/Class/Order between fraction and/or blooms.

### **Nucleotide sequence accession numbers**

The nucleotide reads determined in this study have been deposited to the SRA of EBI database with the accession number: PRJNA274325.

### **Physical and chemical environmental variables**

Water temperature and pH were determined with a multi-parameter probe (HI 98130, HANNA instruments). Chlorophyll-a (Chla) content was determined by spectrophotometry. Total carbon and nitrogen contents were measured using a CHN Elemental Analyser (Elementar Vario EL III, Elementar Analysensysteme GmbH, Hanau, Germany). Phosphorous content was measured by the Olsen method (Olsen et al. 1954). Inorganic nitrogen compounds (N-NO<sub>3</sub>, N-NH<sub>4</sub>) were measured with a continuous-flow nitrogen analyser (SKALAR, San Plus System, Breda, the Netherlands).

## **Results**

### **Eubacterial versus Non-cyanobacterial primers set**

After cleaning, a total of 166 622 and 194 197 high quality reads were obtained for classical (Eub-Pr1) and Non-Cyanobacterial (NC-Pr2) primer sets respectively. As expected, the cyanobacterial reads dominated the Eub-Pr1 dataset with an average of 92% of the reads for the associated fraction and 32.7% for the free-living fraction (Table II. 1.). In the NC-Pr2 dataset, cyanobacterial reads were less abundant with an average of 66.2% in the associated fraction, and 18.7% in the

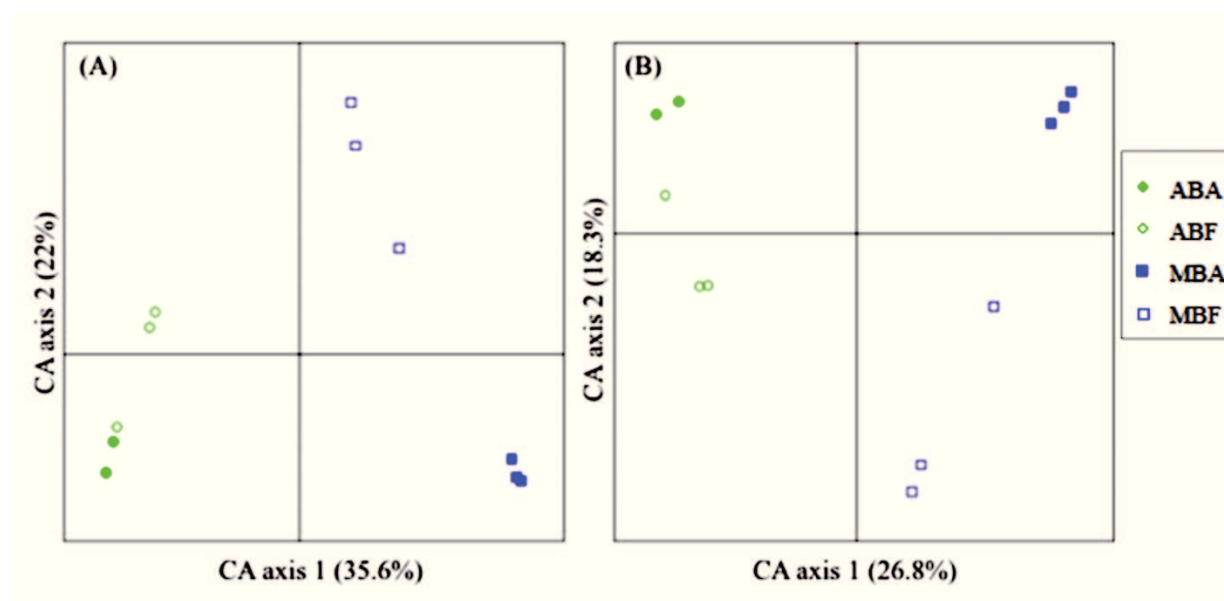
free-living one. Although NC-Pr2 was not fully selective against cyanobacterial 16S rDNA, this primer set decreased the proportion of cyanobacterial reads.

**Table II. 1.: Total cyanobacterial and non-cyanobacterial reads (mean  $\pm$  standard deviation), observed bacterial richness and diversity indices obtained with both primer sets Eub-Pr1 and NC-Pr2.** The average number of OTUs and diversity index were calculated after normalization to the smallest sample (n = 786 reads).

	Associated				Free-living			
	<i>Anabaena</i> bloom		<i>Microcystis</i> bloom		<i>Anabaena</i> bloom		<i>Microcystis</i> bloom	
	Eub-Pr1	NC-Pr2	Eub-Pr1	NC-Pr2	Eub-Pr1	NC-Pr2	Eub-Pr1	NC-Pr2
<b>Average no. reads</b>	12087 ( $\pm 3227$ )	14386 ( $\pm 3014$ )	16727 ( $\pm 1932$ )	14073 ( $\pm 4513$ )	17150 ( $\pm 121$ )	18079 ( $\pm 4600$ )	13606 ( $\pm 2451$ )	22990 ( $\pm 9537$ )
<b>Proportion of cyanobacteria reads (%)</b>	92.7	66.9	92.1	65.6	16.3	1.8	49.2	35.7
<b>Average no. reads without cyanobacteria</b>	883 ( $\pm 135$ )	4757 ( $\pm 1301$ )	1323 ( $\pm 201$ )	4846 ( $\pm 2006$ )	14357 ( $\pm 3640$ )	17754 ( $\pm 4688$ )	6917 ( $\pm 3313$ )	14774 ( $\pm 4110$ )
<b>No. OTUs</b>	94 ( $\pm 20$ )	207 ( $\pm 16$ )	59 ( $\pm 8$ )	132 ( $\pm 25$ )	85 ( $\pm 9$ )	203 ( $\pm 17$ )	117 ( $\pm 5$ )	271 ( $\pm 13$ )
<b>S<sub>chao1</sub> estimate</b>	186.7 ( $\pm 70.2$ )	456.3 ( $\pm 116.6$ )	122.1 ( $\pm 56.7$ )	293.7 ( $\pm 57.5$ )	156.6 ( $\pm 7.5$ )	455.7 ( $\pm 33.4$ )	159.6 ( $\pm 11.4$ )	705.5 ( $\pm 32$ )
<b>S<sub>ACE</sub> estimate</b>	190 ( $\pm 75.1$ )	541.3 ( $\pm 150.3$ )	125.2 ( $\pm 45.8$ )	296.5 ( $\pm 87.3$ )	144.7 ( $\pm 11.6$ )	532 ( $\pm 15.4$ )	163.4 ( $\pm 14.3$ )	751.5 ( $\pm 9.6$ )
<b>Shannon's diversity, H</b>	3.1 ( $\pm 0.8$ )	4.2 ( $\pm 0.1$ )	2.4 ( $\pm 0.2$ )	3.1 ( $\pm 0.4$ )	2.9 ( $\pm 0.6$ )	4 ( $\pm 0.4$ )	4 ( $\pm 0$ )	4.8 ( $\pm 0.1$ )

After normalization (n = 786 due to the high proportion of cyanobacterial reads removed from Eub-Pr1 dataset) the same overall distribution was observed for both primer sets (Figure II. 1.) when BCs were compared at the OTU level (Mantel-test; Pearson  $r = 0.97$ ;  $p$ -value  $> 0.001$ ). A clear discrimination of BC was observed (Figure II. 1.) between bloom-forming genus (*Anabaena* versus *Microcystis*) (first axis) and between associated and free-living states (second axis) (PERMANOVA;  $p$ -value = 0.01). Moreover, with both primers sets, BC distribution of *Anabaena* and *Microcystis* blooms were more distinct (PERMANOVA;  $p$ -value  $< 0.001$ ) than free-living and associated bacterial communities during each bloom (PERMANOVA;  $p$ -value  $< 0.01$ ) (Table II. S1.). The estimated OTUs richness (Table II. 1.) was higher in NC-Pr2 than Eub-Pr1 dataset (ANOVA;  $p$ -value  $< 0.001$ ; Table II. S2). In the same way, the expected richness and diversity index values (S.Chao and ACE values,

Shannon index) were also significantly higher (ANOVA;  $p$ -value < 0.001; Table II. S2) with NC-Pr2 than with Eub-Pr1 dataset (Table II. 1.).



**Figure II. 1.: Correspondence analysis (CA) plot generated from the whole non cyanobacterial OTUs obtained with Eub-Pr1 (A) and NC-Pr2 (B) primer set, showing the distribution of the bacterial community after normalization to the smallest sample (n = 786 reads). (AB) for *Anabaena* bloom, (MB) for *Microcystis* bloom and (F) for free living fraction and (A) for the associated fraction.**

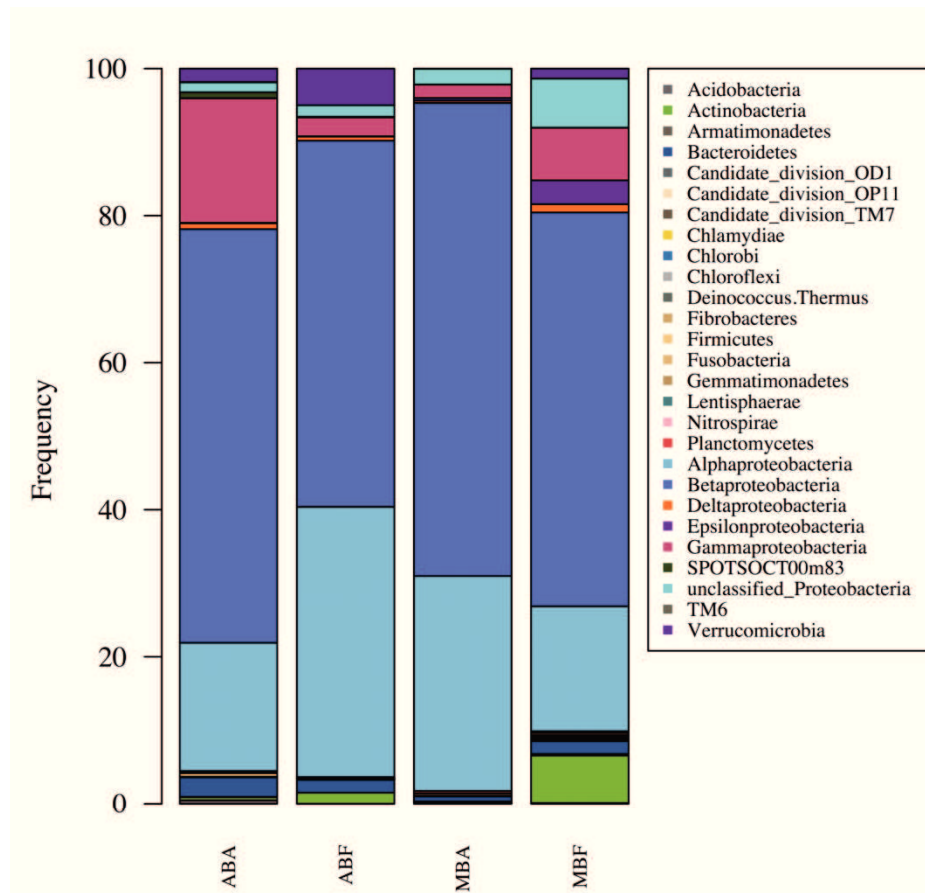
At the phylum level, all fractions were largely dominated by the Proteobacteria, followed by the Bacteroidetes (Figure II. S1.), regardless of the primer set used. Similarly, the presence of Actinobacteria in the free-living fraction and their almost total absence in the associated fraction was observed for both primer sets. The only differences observed between the two primer sets were observed for rare phyla.

In conclusion, both primer sets provided similar results but knowing that the NC-Pr2 primer set (i) allowed a deeper BC description by decreasing the proportion of cyanobacterial 16S rRNA sequences and (ii) did not reduce the richness and diversity in the bacterial communities, the following in depth analysis was performed on data obtained with the NC-Pr2 primers.

### **Comparison of bacterial communities of the *Anabaena* and *Microcystis* blooms**

After normalization all the bacterial communities at the phylum and class levels displayed a similar structure, characterized by the dominance of

*Betaproteobacteria* and to a lesser extent, of *Alphaproteobacteria* and *Gammaproteobacteria* (Figure II. 2.). Within the Proteobacteria phylum, *Betaproteobacteria* was always dominant regardless of the fraction and the bloom. On the other hand, the relative abundance of *Gammaproteobacteria* displayed significant variations within the *Anabaena* and *Microcystis* fractions (Kruskal-Wallis;  $p$ -value < 0.05). Finally, at the phylum level, the proportion of Actinobacteria was always higher in the free-living than in the associated fraction, and this was observed for both blooming cyanobacteria (Kruskal-Wallis;  $p$ -value = 0.01).

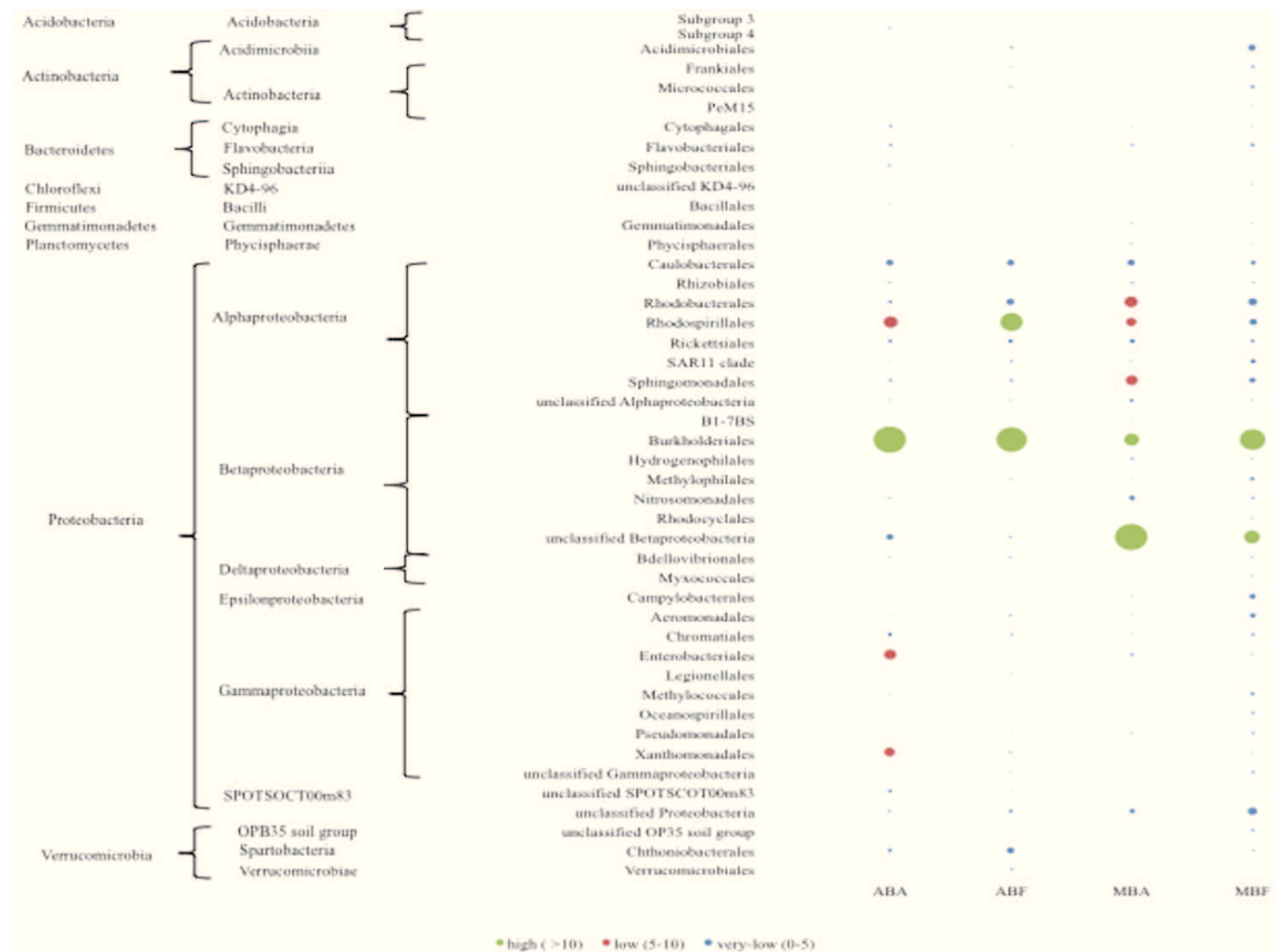


**Figure II. 2.: Relative abundance of the phyla and Proteobacteria classes, expressed as the proportion of the average number of reads from each sample after normalization to the smallest sample (n = 3402). (AB) for *Anabaena* bloom, (MB) for *Microcystis* bloom and (F) for free living fraction and (A) for the associated fraction.**

In contrast, at the OTU level (and also Family level, data not shown), the bacterial communities were clearly discriminated according to the cyanobacteria genus (*Anabaena* or *Microcystis*). As shown in Figure II. 3., the *Sphingomonadales* (Kruskal-Wallis;  $p$ -value < 0.01) and *Nitrosomonadales* (Kruskal-Wallis;  $p$ -value < 0.01) were notably abundant during the *Microcystis* bloom, while the

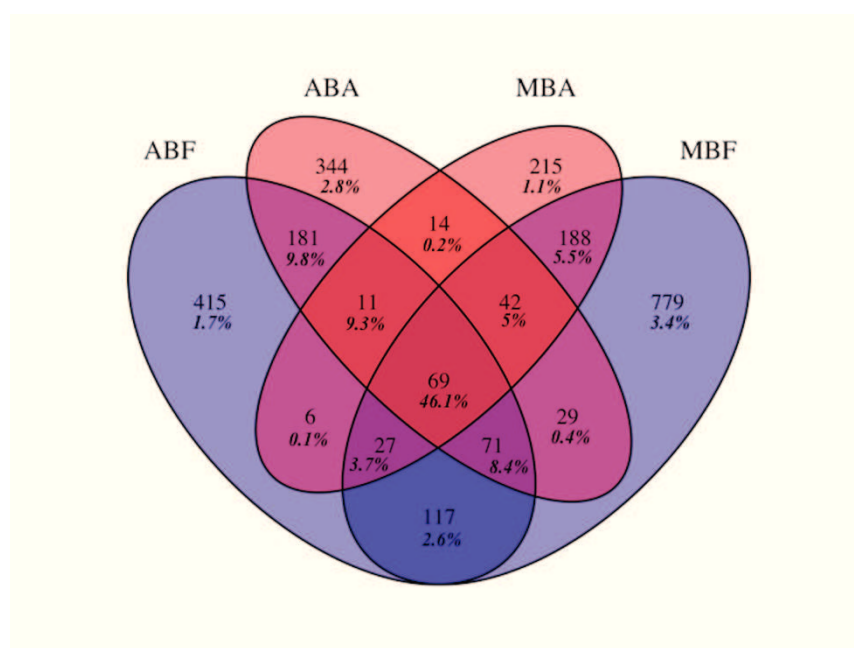
*Xanthomonadales* (Kruskal-Wallis;  $p$ -value  $< 0.01$ ) and *Chthoniobacterales* (Kruskal-Wallis;  $p$ -value  $< 0.05$ ) were more abundant during the *Anabaena* bloom.





**Figure II. 3.: Distribution of the first 100 dominant bacteria OTUs at the order level, expressed as the proportion of the average number of reads obtained from each sample after normalization to the smallest sample. (n = 3402 reads). Circle size indicates the abundance relative to the whole sample for each cyanobacterial species: *Anabaena* (AB) and *Microcystis* (MB)) and fraction: free living (F) or associated (A) bacteria.**

A low number of OTUs were shared by at least three fractions but these OTUs contained a very high number of reads (Figure II. 4.). In contrast, a large majority of OTUs were found in only one fraction (ranged from 215 OTUs to 779 OTUs), however, they represented a very low number of reads (Fig II. 4.). The number of OTUs shared by both free-living bacterial communities (117 OTUs) was more than five-fold higher than those shared by both associated bacterial communities (14 OTUs). This was also observed for the number of reads they contained (2.7 *versus* 0.2%).



**Figure II. 4.: Venn diagram showing the unique and shared OTUs after normalization to the smallest sample (n = 3402 reads).** (AB) for *Anabaena* bloom, (MB) for *Microcystis* bloom and (F) for free living fraction and (A) for the associated fraction. Relative proportions of those OTUs are shown in bold italic.

The dominant OTUs (> 1%, 40 OTUs) accounted for 55.6% and 58.3% of the reads for associated and free-living fractions of *Anabaena* bloom respectively and for 73.1% and 40% of the reads for the associated and free-living fractions of *Microcystis* bloom respectively. The representative sequences of abundant OTUs were blasted to GeneBank® database (Table II. S3. in Annexe 4) and around 10 % of these OTUs displayed a sequence identity value < 98% with sequences from GeneBank®. Among the other OTUs displaying ≥ 98% sequence identity with sequences from GeneBank®, 37,5% of the OTUs sequences were found associated with cyanobacterial blooms and numerous sequences were retrieved in organic-matter-rich ecosystems worldwide (Table II. S3. in Annexe 4).

## Discussion

### Primer set choice

In this study, a high-throughput sequencing approach was used to identify the bacterial taxonomic groups inhabiting the phycosphere of two cyanobacteria that bloomed successively in the same lake. In order to reduce the proportions of cyanobacterial reads that can represent more than 80% of the number of total reads (e.g. Eiler & Bertilsson 2004, Parveen et al. 2013a, Cai et al. 2013) and to increase the proportion of bacterial reads, we tested a specific primer set (NC-Pr2). This set has been previously used to exclude chloroplast and cyanobacterial sequences (Hodkinson & Lutzoni 2010). Even if NC-Pr2 was only tested *in silico* (Annexe 2) and was found to be exclusive to non-cyanobacteria species, it had, to the best of our knowledge, never been tested during a natural cyanobacterial bloom. Our findings have shown that the NC-Pr2 primer set offered the possibility of reducing the number of cyanobacterial sequences compared to that provided by a “classical” primer set (Eub-Pr1), despite the fact that they did not entirely exclude them.

The estimation of the composition of BCs depends on, for a substantial part, the choice of the sequencing strategy and of the targeted DNA region (e.g. Claesson et al. 2010). But, when comparing data obtained by both primer sets, although they don't target the same 16S rDNA regions, the same dominant phyla were retrieved and no major differences were found in the global structure of the communities and in the dominant OTUs. The NC-Pr2 primer set therefore can be used to compare BCs associated with bloom-forming cyanobacteria.

### Associated versus Free-living bacterial communities

We observed that the phyla diversity for the free living or associated BC could be positively or negatively affected, regardless of the cyanobacteria genus. The Proteobacteria dominated in both fractions, suggesting that this phylum is well adapted to occupy the phycosphere. Interestingly, Proteobacteria, and especially the *Betaproteobacteria*, were more abundant in the associated fractions. The *Betaproteobacteria* are known for their high efficiency in degrading dissolved organic matter (DOM) as shown by Niemi et al. (2009), and their abundance seemed to be positively correlated to low-molecular weight algally-derived substrates (Newton et al. 2011). As the phycosphere is described as a hotspot for rapid cyanobacterial cellular turnover and organic matter fluxes (mainly fixed C and N photosynthetates and cellular C and N detritus) (Worm & Søndergaard 1998, Paerl et al. 2000), this

could explain their dominance in both fractions and their higher abundance in the associated fractions. Inversely, both associated fractions appeared to be depleted of Actinobacteria, a phylum that is generally found to be abundant in freshwater ecosystems (Warnecke & Hess 2009, Debroas et al. 2009, Humbert et al. 2009). However, the abundances of the Actinobacteria are also known to decrease in nutrient-enriched ecosystems (Haukka et al. 2006) and to correlate inversely with cyanobacterial abundance, as shown by Ghai et al. (2014) and Parveen et al. (2013a). Thus, the Actinobacteria could be disadvantaged within the phycosphere due to the high bioavailability of DOM.

This suggested that within the phycosphere a specific selection of the bacterial consortium occurred *via* the release of cyanobacterial DOM. Thus, bacterial diversity appears to be driven by the metabolic capacity to degrade cyanobacterial exudates and detrital materials, regardless of the cyanobacterial genus. This assumption is also supported by the analysis of the distribution of the most abundant OTUs in Genbank<sup>®</sup>, where they displayed high sequence similarities with various bacterial sequences generally retrieved in OM-rich ecosystems.

### ***Anabaena* phycosphere versus *Microcystis* phycosphere**

A clear distinction in overall BC structure between *Microcystis* and *Anabaena* blooms was observed, highlighting that each cyanobacterial genus promoted a specific BC within their phycosphere. This was observed for both the associated and free-living fractions status. Within the Proteobacteria, the proportions of *Gammaproteobacteria* were higher in the *Anabaena* phycosphere than in the *Microcystis* phycosphere, while the opposite was true for the *Alphaproteobacteria*. The latter were previously described as being abundant during bloom's development (see for example Shi et al. 2011, Li et al. 2012, Parveen et al. 2013a), however, the abundance varied according to the cyanobacterial growth status. Recently, the *Gammaproteobacteria* that are usually found at very low abundances in freshwater lakes (Zwart et al. 2002), were strongly enriched in the Venice lagoon, probably as a consequence of their copiotrophic metabolism (Simonato et al. 2010). It is known that quantity and quality of DOM produced during primary production depends on many factors including the species, physiological state and nutrient limitation (Renaud et al. 2005). Therefore it is probable that the DOM produced by cyanobacteria during the course of the bloom would vary in term of quality, quantity and, subsequently, bioavailability according to the species and the growth stage

(Leloup et al. 2013, Becker et al. 2014). Therefore, the different relative proportions of *Alpha*- and *Gammaproteobacteria* between *Anabaena* and *Microcystis* blooms could be due to different DOM qualities and quantities within the phycosphere of *Anabaena* and *Microcystis*, and as a consequence of the different sampling times (beginning of decline phase for *Anabaena* bloom and the exponential phase for *Microcystis* bloom, Table II. S4.).

Moreover, a high relative proportion of Verrucomicrobia occurred during the *Anabaena* bloom, supporting the hypothesis of a direct impact of the cyanobacteria on the bacterial communities. This phylum is known to be associated with high-nutrient environments or algal blooms (Haukka et al. 2006, Kolmonen et al. 2004). Recently, (Parveen et al. 2013b) showed that cyanobacterial biomass could positively affect particle-associated Verrucomicrobial communities and that nitrate and inorganic nutrients could influence their dynamics (Haukka et al. 2006, Parveen et al. 2013b).

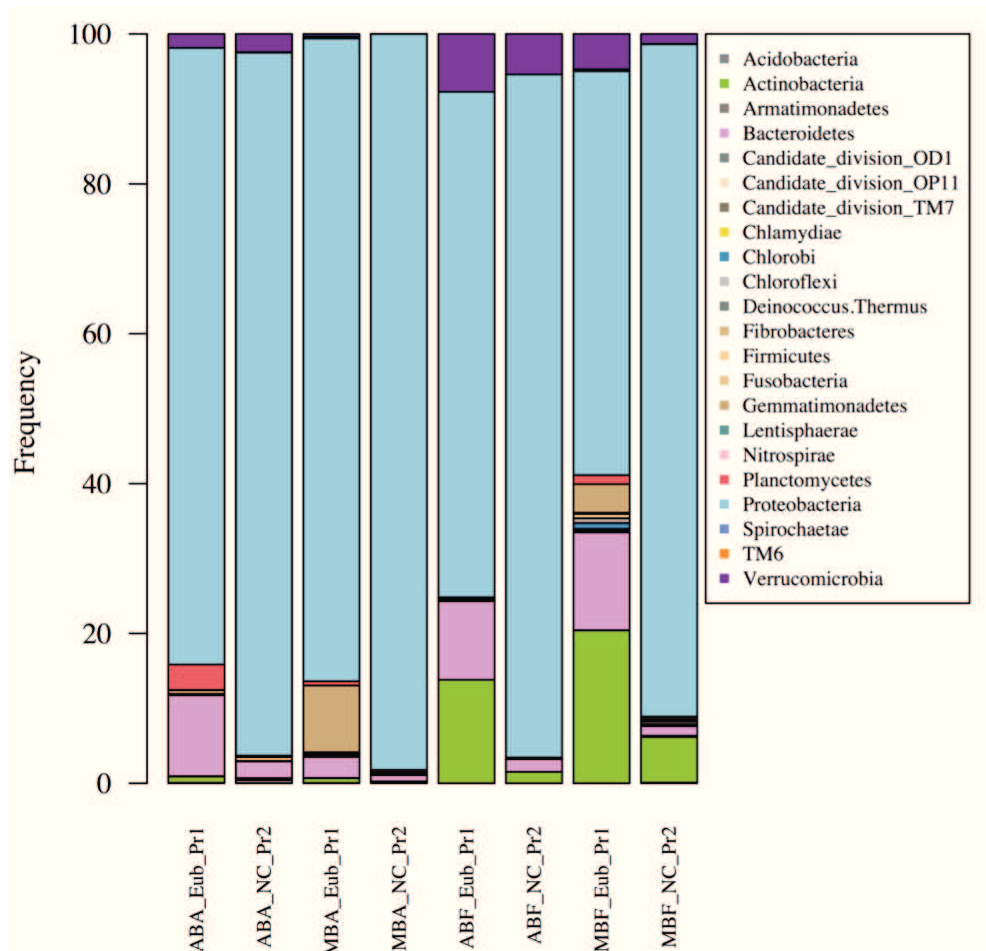
In parallel, within the *Betaproteobacteria*, the proportion of *Nitrosomonadales* increased during the *Microcystis* bloom. Interestingly, this group encompasses bacteria involved in the nitrification (ammonia oxidation activity), one of the key steps for nitrogen recycling. The presence of this specific functional N-recycling group has already been highlighted in several studies, but only associated with N<sub>2</sub>-fixing cyanobacteria and during marine blooms and in the Baltic Sea for example, where no nitrification activity could be detected (Hietanen et al. 2002b, Tuomainen et al. 2003). More recently, Ploug et al. (2010, 2011) have shown in the Baltic Sea that *Aphanizomenon* sp. and *Nodularia* sp. could release a high proportion of the photosynthates (35%) as NH<sub>4</sub><sup>+</sup>. It is also known that during successive blooms of *Anabaena* and *Microcystis* (Yamamoto 2009, Caldwell Eldridge et al. 2013), the fixed N pool could facilitate the following *Microcystis* bloom and thus enhance the functional groups involved in N-recycling.

Overall, we could hypothesize that cyanobacteria promotes the diversity of their phycosphere BC based on their metabolic capacities for degrading their specific DOM. The phycosphere might also promote functional groups involved in N-recycling thereby supporting the mutualistic interactions between bacteria and N<sub>2</sub>-fixing and non N<sub>2</sub>-fixing cyanobacteria.

## **Acknowledgements**

We would like to thank Emma Rochelle-Newall for linguistic improvement and help for the physicochemical measurements and Jacques Pedron for his bioinformatics support.

## Supporting Information



**Figure II. S 1.: Relative abundance of the phyla obtained with with Eub-Pr1 and NC-Pr2 primer set, expressed as the proportion of the average number of reads after normalization to the smallest sample (n = 786 reads). (AB) for *Anabaena* bloom, (MB) for *Microcystis* bloom, (F) for free living fraction and (A) for the associated fraction.**

**Table II. S 1.: Permutational MANOVA comparing bacterial community composition obtained with Eub-Pr1 and NC-Pr2 primer set (n=786). (Fraction) for the associated and free-living fractions and (Bloom) for cyanobacterial genera.**

	<i>df.</i>		<i>F</i>		<i>R</i> <sup>2</sup>		<i>Pr</i> (> <i>F</i> )	
	Eub-Pr1	NC-Pr2	Eub-Pr1	NC-Pr2	Eub-Pr1	NC-Pr2	Eub-Pr1	NC-Pr2
<b>Fraction</b>	1	1	5.712	8.497	0.205	0.228	<b>0.003</b>	<b>0.001</b>
<b>Bloom</b>	1	1	11.856	18.287	0.426	0.491	<b>&lt; 0.001</b>	<b>&lt; 0.001</b>
<b>Fraction × Bloom</b>	1	1	3.234	3.451	0.116	0.092	<b>0.024</b>	<b>0.03</b>

**Table II. S 2.: Comparison (ANOVA) of number of reads, number of OTUs and diversity indexes after normalizing to the smallest sample (n = 786 reads).** (Fraction) for associated and free-living fractions, (Bloom) for the cyanobacterial genus and (Primer) for the primer set used.

	OTU			Shannon's diversity, <i>H</i>			<i>S</i> <sub>Chao1</sub>			<i>S</i> <sub>ACE</sub>		
	<i>df</i>	<i>F</i> value	<i>p</i> -value	<i>df</i>	<i>F</i> value	<i>p</i> -value	<i>df</i>	<i>F</i> value	<i>p</i> -value	<i>df</i>	<i>F</i> value	<i>p</i> -value
Primer	1	319.5	<0.001	1	30.93	<0.001	1	226.27	<0.001	1	222.94	<0.001
Fraction	1	64.30	<0.001	1	23.29	<0.001	1	28.38	<0.001	1	24.40	<0.001
Bloom	1	0.315	0.583	1	1.05	0.322	1	0.81	0.382	1	0.01	0.919
Fraction×Primer	1	13.45	0.002	1	0.15	0.704	1	23.61	<0.001	1	23.26	<0.001
Bloom×Primer	1	0.025	0.874	1	1.09	0.312	1	4.56	0.05	1	0.38	0.545
Fraction×Bloom	1	65.19	<0.001	1	29.04	<0.001	1	29.68	<0.001	1	28.58	<0.001
Fraction×Bloom×Primer	1	8.265	0.012	1	0.01	0.905	1	15.32	0.001	1	13.81	0.002

**Table II. S 3.: Blast analysis on the abundant OTUs per sample (>1%) after normalization to the smallest sample (n = 3402 reads).** (F) for free living fraction and (A) the associated faction, (AB) for the *Anabaena* and (MB) for the *Microcystis* blooms. When the OTU sequence is shared at least 98% with more than 100 sequences in GenBank™, the first 20 sequences were analyzed. (See Annexes 4).

**Table II. S 4.: Physicochemical measurements of lakewater for both cyanobacterial blooms.** Chlorophyll-*a* content (Chl *a*), Nitrate (NO<sub>3</sub>), Ammonium (NH<sub>4</sub>), Dissolved Inorganic Nitrogen (DIN), Particular Organic Nitrogen (PON), Particular Carbon (PC), Dissolved Organic Carbon (DOC), Particular Phosphorus (PP) and Dissolved Inorganic Phosphorus (DIP).

	Chl <i>a</i> (μg L <sup>-1</sup> )	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> (mg L <sup>-1</sup> )	NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> (mg L <sup>-1</sup> )	DIN (mg L <sup>-1</sup> )	PON (mg L <sup>-1</sup> )	PC (mg L <sup>-1</sup> )	DOC (mg L <sup>-1</sup> )	PP (mg L <sup>-1</sup> )	DIP (mg L <sup>-1</sup> )
<i>Anabaena</i> Bloom replicate 1	1689.2	0.13	0.17	0.3	7.6	44.4	10.2	0.07	0.2
<i>Anabaena</i> Bloom replicate 2	1502.6	0.28	0.29	0.57	16.2	55.2	16.1	0.11	0.2
<i>Anabaena</i> Bloom replicate 3	1344.9	0.1	0.29	0.39	17.6	77.9	18.5	0.09	0.3
<i>Microcystis</i> Bloom replicate 1	570.5	0.13	0.17	0.3	10.1	55.2	12.4	0.09	0.2
<i>Microcystis</i> Bloom replicate 2	368.2	0.11	0.3	0.41	8.2	41.0	11.5	0.04	0.2
<i>Microcystis</i> Bloom replicate 3	1591.4	0.09	0.18	0.27	na	na	13.9	1.5	0.2





### 3. Diversités structurelles et fonctionnelles des phycosphères cyanobactériennes des milieux lacustres

#### **Bacterial communities associated with four cyanobacterial genera display differences in their structural and functional diversities: Evidence from an experimental approach**

Lin Zhu<sup>1,2\*</sup>, Anouk Zancarini<sup>2\*</sup>, Imen Louati<sup>2\*</sup>, Silvia De Cesare<sup>2</sup>, Charlotte Duval<sup>3</sup>, Kevin Tambosco<sup>2</sup>, Cécile Bernard<sup>3</sup>, Didier Debroas<sup>4</sup>, Lirong Song<sup>1</sup>, Julie Leloup<sup>2</sup>, and Jean-François Humbert<sup>2</sup>

<sup>1</sup>State Key Laboratory of Freshwater Ecology and Biotechnology, Institute of Hydrobiology, CAS, Wuhan, China

<sup>2</sup>EEES - Paris, UMR 7618, 4 Place Jussieu, Paris, France

<sup>3</sup>UMR 7245 MCAM MNHN-CNRS, Muséum National d'Histoire Naturelle, Sorbonne Universités, CP 39, 57 rue Cuvier, F-75231 Paris Cedex 05, France

<sup>4</sup>LMGE, Université de Clermont-Ferrand, Clermont-Ferrand, France

\*These three authors have equally contributed to this work

#### **Summary**

To overcome the limitations of working in natural environments on the interactions between bacterial communities (BC) and cyanobacteria, we compared the structural and functional diversities of the BC associated with fifteen non-axenic cyanobacterial strains in culture and of two natural BC sampled during cyanobacterial blooms. When comparing the natural and cultivated BC, no significant differences were found in their richness and diversity, although some of the cyanobacterial strains had been isolated 11 years earlier. Moreover, all of these BC displayed a similar global structure that differed substantially from that of the BC communities sampled from freshwater ecosystems without cyanobacterial blooms, suggesting that the organic matter produced by cyanobacteria has a strong influence on the structure of BC. Furthermore, BC associated with heterocystous cyanobacterial strains (*Aphanizomenon* - *Anabaena*) displayed significant differences in their composition and in their ability to use different carbon sources from BC associated with non-heterocystous strains (*Planktothrix* - *Microcystis*). This

result implies a direct influence of the metabolism of cyanobacteria on their associated BC. This study also revealed that half of the dominant OTU seems to be specialized to associate with cyanobacteria or other phytoplankton, whereas the other half corresponds to generalist species occupying varied environments with a high organic matter content.

## **Introduction**

In the ten last years, a growing number of studies have been published on the bacterial communities (BC) associated with phytoplankton blooms in freshwater and marine ecosystems. In marine ecosystems, a limited number of heterotrophic bacterial lineages displaying distinct metabolic strategies dominate these BC (see review of Buchan et al. 2014). In freshwater ecosystems, most of the studies have been focused on cyanobacterial blooms, owing to the large impact of these blooms on these ecosystems (e.g. Dodds et al. 2009). For example, epiphytic bacteria and archaea are directly associated with cyanobacteria (e.g. Stevenson & Waterbury 2006, Grossart et al. 2011, Woodhouse et al. 2013) and several bacterial species are able to degrade cyanotoxins in order to use them as a carbon or nitrogen source (e.g. Maruyama et al. 2004, Zhu et al. 2014). Numerous publications have also evaluated the impact of cyanobacterial blooms on the structure and composition of bacterial communities (BC) sharing the same ecosystems (e.g. Eiler & Bertilsson 2004, Berg et al. 2009). Among these papers, most of them concern *Microcystis* sp., a toxic bloom-forming cyanobacteria, because of its high prevalence in many ecosystems around the world and because its colonial organization offers a potential niche and physical support for direct interactions with heterotrophic prokaryotes (e.g. Shen et al. 2011, Li et al. 2012, Shi et al. 2012, Shao et al. 2014). Most of these studies were performed on natural samples and they have provided interesting findings. For example, BC associated with cyanobacteria is distinct from free-living ones, suggesting that direct interactions occur between cyanobacteria and bacteria (Parveen et al. 2013a, Cai et al. 2014).

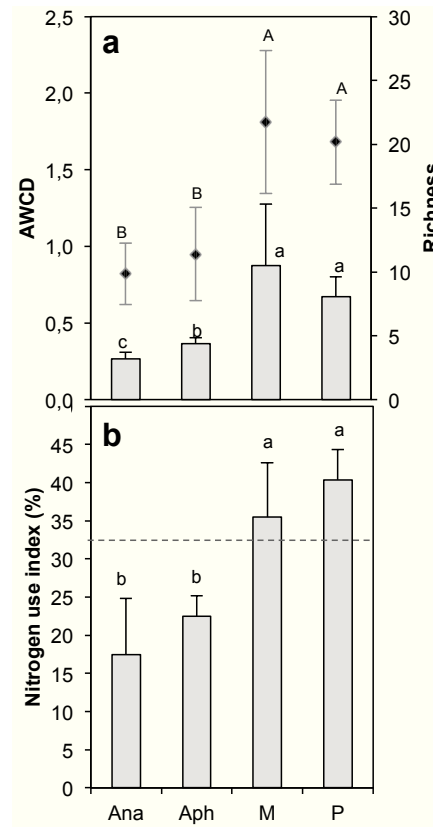
However, the numerous environmental factors and processes that impact BC in natural environments (see Dziallas & Grossart 2011) make separating the influence of the cyanobacteria from that of the environment difficult. In order to overcome these constraints, we chose to compare the functional and structural diversities of BC associated with fifteen non-axenic cyanobacterial strains belonging

to four genera: *Microcystis*, *Planktothrix*, *Aphanizomenon* and *Anabaena*. Three main questions were addressed in this work. The first aim was to identify the main factors impacting the composition of BC associated with cyanobacteria in culture, in light of the fact that the cyanobacterial strains differed in characteristics such as their cellular organization (isolated cells, filaments, colonies), country of origin, and N<sub>2</sub>-fixing capacities (heterocystous versus non-heterocystous strains). The second aim was to determine whether high richness and diversity could be maintained within the BC associated with cultivable cyanobacteria, knowing that the strain isolation dates were different, from one to eleven years prior to our study. The third aim was to assess whether the structure and composition of BC associated with cyanobacteria in culture were similar to those of BC from natural blooms. Indeed, BC from two natural blooms of *Microcystis* and *Anabaena* occurring in a pond located in Paris were assessed and compared to two of fifteen cultivated strains isolated from the same pond. The structural diversity was assessed using a pyrosequencing approach performed on a fragment of the 16S rRNA gene, and the functional diversity was assessed by a Biolog approach (Ecoplates; Biolog, Hayward CA, USA).

## Results

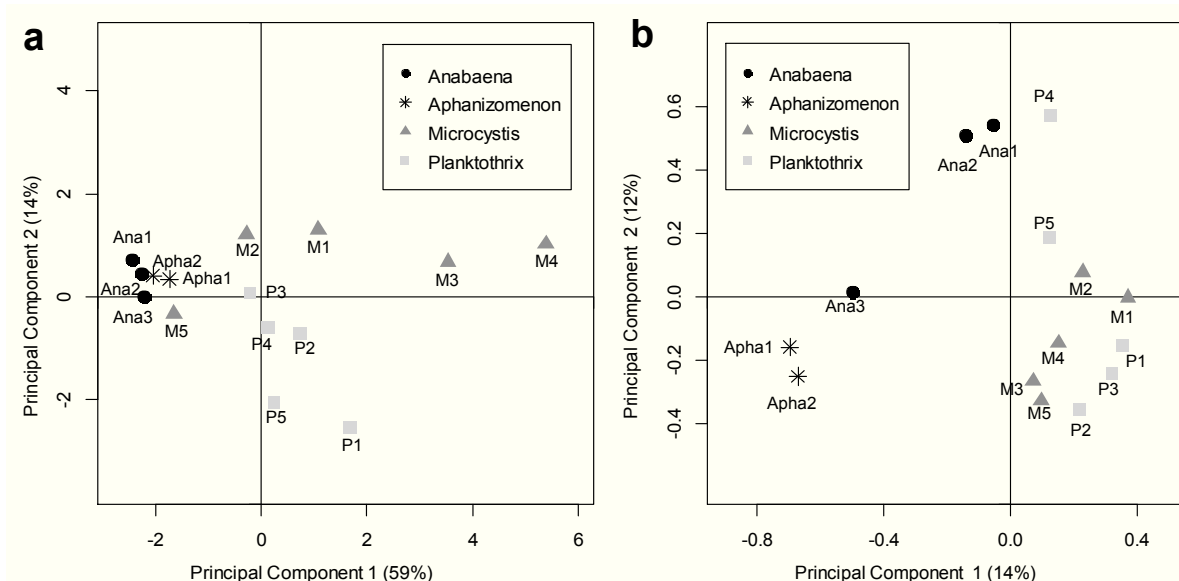
### Carbon and nitrogen metabolic activities of BC associated with cyanobacterial cultures

In order to determine whether the association between cyanobacteria and BC could lead to the selection of specific metabolisms, the catabolic profiles of the BC were measured by a Biolog approach. The number of carbon substrates and the average well-color development (AWCD) were significantly higher ( $p < 0.001$ ) for BC associated with non-N<sub>2</sub>-fixing cyanobacteria (N<sub>2</sub>-) (*Microcystis* and *Planktothrix* strains) than for those associated with the N<sub>2</sub>-fixing cyanobacteria (N<sub>2</sub>+) (*Anabaena* and *Aphanizomenon* strains) (Figure II. 1. a and Figure II. S1.). More specifically, amino acids, carbohydrates and phenolic substances were highly consumed by BC associated with the N<sub>2</sub>- cyanobacteria (Figure II. S2.). In the same way, the nitrogen use index (Urakawa et al. 2013) was significantly higher ( $p < 0.001$ ) for BC associated with N<sub>2</sub>- than for those associated with N<sub>2</sub>+ cyanobacteria (Figure II. 1. b).



**Figure II. 1.: Comparative use of the 31 carbon substrates in the Biolog plates by the bacterial communities associated with cyanobacterial strains in culture belonging to four genera (a) and comparison of the Nitrogen use index by these bacterial communities (b).** Abbreviations: Ana: *Anabaena* strains; Aph: *Aphanizomenon* strains; M: *Microcystis* strains; P: *Planktothrix* strains; AWCD: Average well-color development (histograms)

Finally, a principal component analysis was performed revealing a clear distinction between the BC associated with *Anabaena* and *Aphanizomenon* strains that grouped together, and those associated with *Planktothrix* and *Microcystis* strains ( $p < 0.001$ , Permanova analysis) (Figure II. 2. a). Furthermore, the BC associated with the different *Microcystis* strains, and to a lesser extent to the *Planktothrix* strains, displayed a higher variability in their carbon sources than those associated with the *Anabaena* and *Aphanizomenon* strains.



**Figure II. 2.: Principal Component Analyses performed (a) on the use of the 31 carbon sources (Ecoplate approach) and (b) on the OTU composition (pyrosequencing approach) of the bacterial communities associated with the cyanobacterial strains in culture.**

### Structure and composition of BC associated with cyanobacterial cultures

From the overall structure of the BC, Proteobacteria (in particular *Alphaproteobacteria*) and Bacteroidetes were the two most abundant phyla in all culture samples (Figure II. 3.) while the read numbers of other phyla did not exceed 3.3% (0.92 to 3.26%). Even if the global structures of BC communities were very similar in all the cyanobacterial genera, some groups of these BC were detected preferentially in only one cyanobacterial genus (Figure II. 3.).

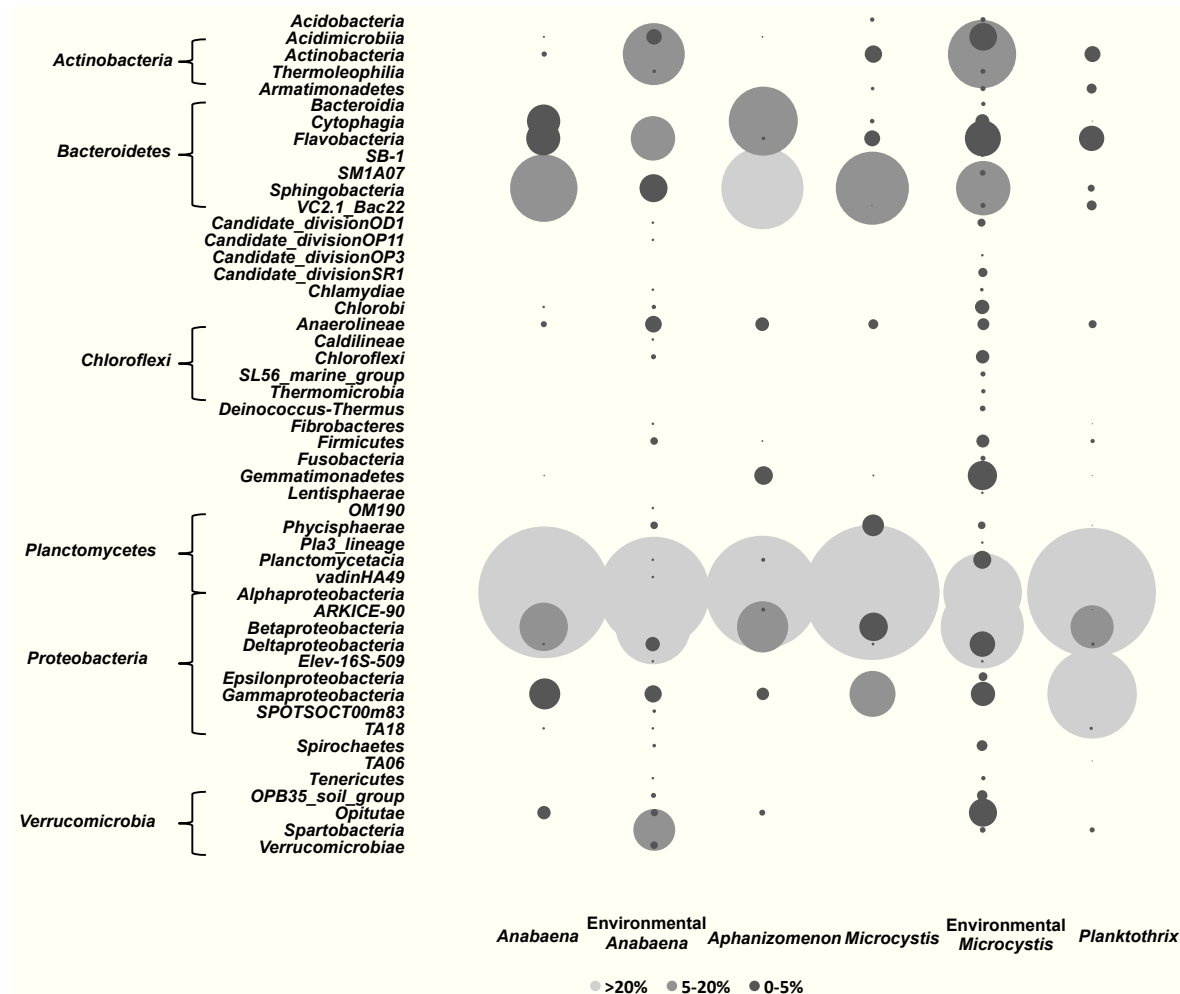
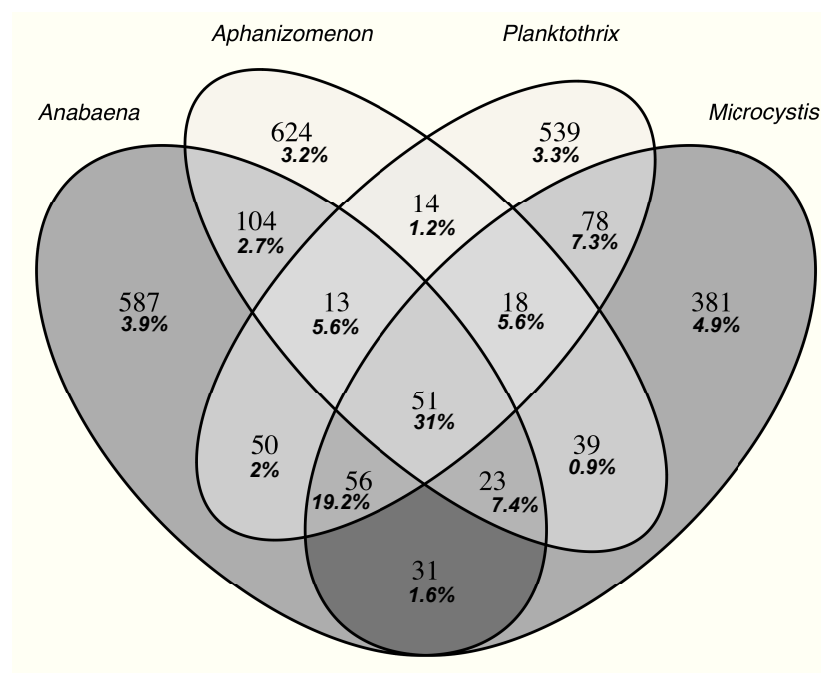


Figure II. 3.: Relative abundance of main groups found in the bacterial communities associated with the four cyanobacterial genera in culture and with the two natural blooms of cyanobacteria after normalization to the smallest sample (n = 4284).

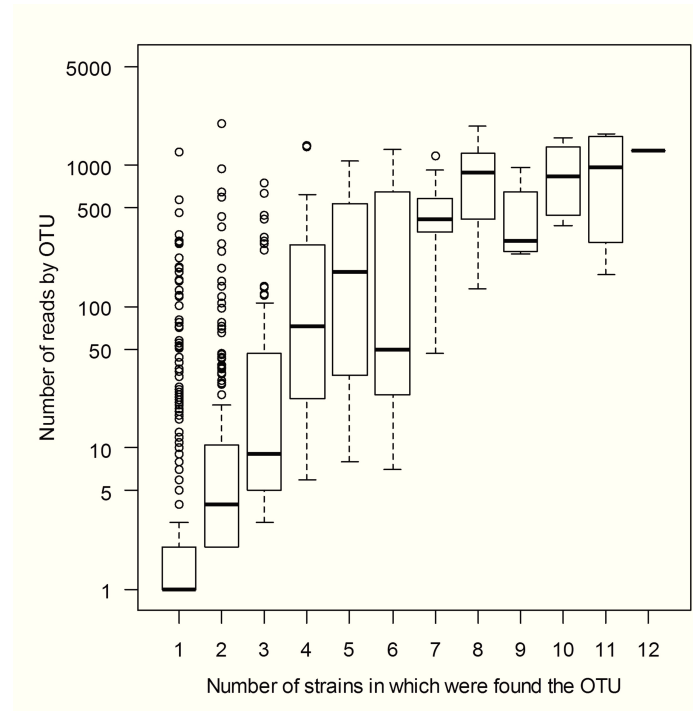
For example, Planctomycetes were mainly found in BC associated with *Microcystis* strains, whereas *Cytophagia* (Bacteroidetes) were mainly found in cultures of heterocystous cyanobacteria. When comparing the BC obtained for each genera after pooling the sequences obtained in each strain, only 51 OTU (of 2608; less than 2%) were shared by BC associated with the four cyanobacteria genera, but these OTU contained more than 30% of the sequences (Figure II. 4.).



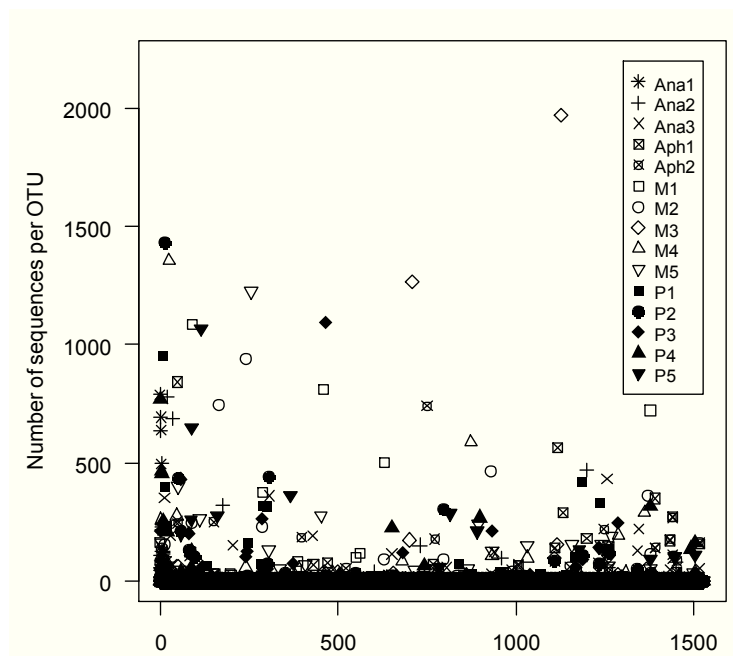
**Figure II. 4.: Venn diagram showing the distribution of all the bacterial OTU found in BC associated with the four cyanobacterial genera in culture, after normalization to the smallest sample (n = 4284). The percentages of reads contained by these OTU are shown in bold italic.**

When looking at each strain, no OTU was shared by all of the 15 cultivated cyanobacterial strains and only one OTU was found in 12 of them. Most of the OTU (96%) were found in fewer than five cyanobacterial strains and they generally contained a very low number of sequences (see median values in Figure II. 5.), except for some of them that were very abundant in only one strain. This pattern is clearly illustrated by the rank-abundance figure (Figure II. 6.), which illustrates that OTU that were rare in some BC were abundant in others.





**Figure II. 5.:** Boxplot diagram of the distribution of abundance (number of reads) of each bacterial OTU found in bacterial communities associated with the cyanobacterial strains in culture as a function of the number of cyanobacterial strains where each of these OTU was found.



**Figure II. 6.:** Rank-abundance distribution of the bacterial OTU found in association with the fifteen cyanobacterial strains in culture. The ranking of these bacterial OTU was first performed on the bacterial community associated with one *Anabaena* strain (Ana1) and this ranking was kept for all bacterial communities associated with other cyanobacterial strains in culture.

However, even though the abundances of the different OTU in the BC could display very large variations from one cyanobacterial culture to another, the relationship between the number of strains where the OTU were found and the number of sequences these OTU contained was positive overall (Figure II. 5.).

We then performed a BLAST analysis on the 100 most abundant OTU in order to determine in the Genbank® (GB) database the origin of sequences displaying at least 98% sequence identity with our most abundant OTU and in what quantity these sequences are found. Interestingly, these dominant OTU displayed a bimodal distribution in regard to the number of sequences sharing  $\geq 98\%$  sequence identity in GB (Figure II. 3.). This finding indicates that for more than 50% of these OTU, only a restricted number of sequences were found in GB (less than 50 sequences for each of these OTU), whereas for the rest of the sequences, numerous matches found in GB (more than 100 sequences, frequently several hundred). When few sequences were retrieved in GB, almost all of these sequences were found in freshwater ecosystems, and most of them were associated with cyanobacterial blooms (Table II. S1. in Annexe 5). On the other hand, when more than 100 sequences were retrieved in GB, these sequences originated from various ecosystems that were generally characterized by a high level of organic matter (including freshwater ecosystems, but also wastewater sludge, sediment, human waste and skin, soil etc.) (Table II. S1. in Annexe 5). All of these findings suggest that BC communities associated with cyanobacteria in culture contained a mixture of generalist bacteria that are found in many organic-matter-rich environments and of more specialized bacteria that are closely associated with cyanobacteria.

Notably, among the 100 most abundant OTU (containing  $>79\%$  of the reads), half of them belong to *Alphaproteobacteria*, including several potentially  $N_2$ -fixing species belonging to the *Rhizobiales* order (12 OTU representing 1% to 31% of the total sequences of the BC associated with the different cyanobacterial genera), followed by Bacteroidetes and *Gammaproteobacteria* species (Table II. S1. in Annexe 5).

By a principal component analysis performed on the distribution of all of the bacterial OTU in BC associated with the 15 cyanobacterial strains, a significant distinction ( $p < 0.001$ , Permanova analysis) between BC associated with the  $N_2+$  cyanobacteria and those associated with  $N_2-$  cyanobacteria was observed along the

first axis of the analysis (Figure II. 2.b). Moreover, when testing the potential effect of all characteristics of the fifteen cyanobacterial strains (genus, sampling data, sample origin), only the cyanobacterial genus has a significant effect on the distribution of BC on the first axis of the PCA ( $p = 0.032$ , data not shown). Finally, a co-inertia analysis revealed a significant correlation between the two PCA analyses performed on the 454-pyrosequencing and on the Ecoplate data ( $p < 0.012$ , Mantel test).

### Comparison of BC structural diversity associated with cyanobacteria in culture and those sampled from the environment

When comparing the BC associated with cyanobacteria in culture and those associated with natural blooms of *Anabaena* and *Microcystis*, these communities mainly differ in the relative importance of Actinobacteria and *Betaproteobacteria* and to a lesser extent of Verrucomicrobia (Figure II. 3.). After normalization, no significant difference (by Kruskal-Wallis test) was found at the OTU level, in the diversity indices (richness, Shannon and Chao1) of the BC associated with the cyanobacterial strains in culture (*Anabaena*, *Aphanizomenon*, *Planktothrix* and *Microcystis*) and the BC associated with cultivated cyanobacterial strains and natural cyanobacterial blooms (Table II. 1. and Figure II. S4.).

**Table II. 1.: Richness, Chao1 and diversity values estimated in the bacterial communities associated with cyanobacteria in culture and with the two environmental samples**

	Richness	Chao1	Shannon
<i>Anabaena</i>	205 ± 76	385 ± 242	3.3 ± 0.4
Environmental sample of <i>Anabaena</i>	269	446	3.6
<i>Aphanizomenon</i>	224 ± 86	408 ± 171	3.4 ± 0.4
<i>Microcystis</i>	119 ± 31	201 ± 58	2.5 ± 0.5
Environmental sample of <i>Microcystis</i>	360	505	4.8
<i>Planktothrix</i>	162 ± 20	259 ± 54	3.0 ± 0.2

All of these findings suggest that BC communities associated with cyanobacteria in culture have maintained a high level of richness and diversity, even though some of them were cultivated for more than 11 years. The comparison between the two environmental samples from the Champs-sur-Marne pond and the two cultivated strains of *Microcystis* and *Anabaena* isolated from the same pond revealed that even though only 15% of the OTU were shared between BC in culture and in the environment, these OTU contained more than 36% of all the sequences (Figure II. 5.). Much more OTU (170) and sequences (>40% of the total number of

sequences) were shared by the two BC associated with natural blooms than between the two cultivated strains of cyanobacteria isolated at the same place (only 31 OTU containing 11.8% of the sequences).

## Discussion

Our findings have clearly shown that BC associated with the four cyanobacterial genera display differences in their structural and functional diversity. In particular, BC associated with heterocystous genera (*Aphanizomenon* and *Anabaena*) were clearly distinguished from those associated with non-heterocystous genera (*Microcystis* and *Planktothrix*). Within these two groups, the separation between BC associated with each genus was less evident. The significant congruence in the results provided by the Ecoplate and pyrosequencing approaches suggests that differences found in the OTU composition of the BC associated with cyanobacteria in cultures have consequences on their functional potential to use the various sources of carbon in Ecoplates. As shown in natural environments (Sarmiento & Gasol 2012, Landa et al. 2014) and in culture (Landa et al. 2014, Bagatini et al. 2014), the composition of microbial 175 communities in aquatic ecosystems is strongly influenced by the quality and the quantity of organic matter available in these systems. Moreover, Becker et al. (2014) showed that the degree of similarity in the quality of the dissolved organic matter (DOM) produced by various phytoplankton species, including cyanobacteria, is linked to their phylogenetic relationship. As *Anabaena* and *Aphanizomenon* are phylogenetically closely related, and belong to the order Nostocales, the composition of the DOM they produce could be very similar, leading to the selection of BC with similar abilities to use organic matter. Similarly, our Ecoplate approach revealed that BC associated with N<sub>2</sub>-cyanobacteria were characterized by a greater nitrogen use index than BC associated with N<sub>2</sub>+ cyanobacteria, illuminating the direct influence of cyanobacteria on the BC associated with them. Indeed, N<sub>2</sub>+ fixing cyanobacteria release significant amounts of NH<sub>4</sub><sup>+</sup> (Ploug et al. 2011), which can be used by the BC associated with them, explaining the bacteria's lower capacities to use nitrogen from carbon sources provided by the Ecoplate.

When considering the OTU level, most of the dominant OTU were found in several cyanobacterial genera, but differences between BC were mainly due to variations in the relative abundances of these OTU. Interestingly, the dominant OTU

found in BC associated with cyanobacteria in culture can be grouped in two categories: the OTU specifically associated with cyanobacteria or other phytoplankton species and those found in varied environments characterized by a high quantity of organic matter (sludge, human waste, rhizosphere etc.). Among these widely distributed OTU, several were closely related to *Rhizobium* species, which are closely associated with plant roots and can fix free nitrogen even if they are free-living (Dreyfus et al. 1983, Ludwig 1984, Alazard 1990). This finding is very important when considering that in eutrophic freshwater ecosystems, nitrogen may become limiting for phytoplankton growth (Kolzau et al. 2014, Mischler et al. 2014).

Concerning the second aim, our data clearly show that BC associated with the different strains of cyanobacteria in culture displayed profound richness and diversity, even if some of these strains were isolated from field samples more than eleven years ago. Indeed, due to processes like the founder effect and genetic drift, reduced diversity was expected in the BC associated with the cultivated cyanobacterial strains that had been in culture for a long time. On the other hand, two main processes might be involved in the conservation of diversity in BC. First, as already mentioned, the quality and the quantity of organic matter produced by Cyanobacteria change during the course of their growth (Leloup et al. 2013) and these changes could impact the composition of microbial communities (Sarmiento & Gasol 2012, Landa et al. 2014, Bagatini et al. 2014). Second, recent works have studied the influence of bacteriophages on the dynamics and the diversity of bacterial communities, and this factor could contribute to the high level of richness in our cultured communities ( see reviews of Wommack & Colwell 2000, Sime-Ngando 2014). Supporting the potential relevance of these two hypotheses, some of the numerous rare OTU were found to be abundant in one culture, which suggests the existence of strong temporal variations in the abundance of these OTU.

Finally, in regard to our third question about the comparison between BC communities living in cultures of cyanobacteria and those living in freshwater ecosystems hosting blooms of cyanobacteria, we have shown that these BC shared the same global structure, even if some differences were evident between them. This shared structure between BC living in freshwater ecosystems hosting cyanobacterial blooms and BC living in cultures without any other sources of organic matter than that provided by cyanobacteria suggests that the organic matter produced during cyanobacterial blooms occurring in freshwater ecosystems strongly impacts BC

living in these ecosystems. This hypothesis is supported by the presence of several Gammaproteobacteria among the dominant OTU found in the BC associated with cyanobacteria in culture and in natural environments (Shi et al. 2012, Parveen et al. 2013a). Indeed, Gammaproteobacteria are generally very poorly represented in BC living in freshwater ecosystems (Debroas et al. 2009, Humbert et al. 2009) but their copiotrophic character (Simonato et al. 2010, Buchan et al. 2014) and the high quantity of organic matter produced by cyanobacteria might explain their increasing presence during cyanobacterial blooms. Interestingly, consistent with previous data published by Bomo et al. (2011), several Gammaproteobacteria OTU were closely related to species known to be pathogenic, suggesting that blooms of may play a role in the survival or the development of opportunistic pathogenic bacteria in freshwater ecosystems. Consequently, studies may be needed to determine the health risks generated by the presence of these pathogenic bacteria during the blooms in addition to the known risks from cyanotoxins. The slight differences found between BC sampled in cyanobacterial cultures and those found in natural blooms could be explained by the fact that BC from natural samples contain a mix of bacteria that are closely associated with cyanobacteria (and consequently under their direct influence) and bacteria that are not under the direct influence of cyanobacteria (perhaps because of their location or their ability to use other carbon sources available in the ecosystem). Alternatively, cyanobacteria might be able to produce metabolites that inhibit the growth of some bacterial species. This view is consistent with the fact that Actinobacteria have been mainly retrieved from natural samples; Actinobacteria are abundant in freshwater ecosystems (Humbert et al. 2009), but their relative importance decreases during the development of cyanobacterial blooms (Parveen al. 2013a). Finally, some cyanobacteria produce bioactive natural products with antimicrobial activities against all Gram+ bacteria, including Actinobacteria (Luo et al. 2014).

In conclusion, this study reveals that the BC associated with cyanobacterial strains in culture are complex and closely represent those found in natural ecosystems during cyanobacterial blooms, demonstrating the utility of this model for the study of interactions occurring between heterotrophic bacteria and cyanobacteria. The second original contribution of this paper is the finding that BC associated with different cyanobacterial genera displayed functional and structural differences, which seemed to be related to the phylogenetic relationships existing

between these cyanobacterial genera and to the quality of the organic matter they produce. Finally, our data show that BC associated with cyanobacteria are composed of a mix of generalist and specialist species, which is an interesting outcome that will be explored in our future works.

## **Materials and methods**

### **Experimental design**

The fifteen selected non-axenic cultures belong to the "Paris Museum Collection" (PMC) collection of cyanobacteria. A description of the different genera and geographical origins is provided in Table II. 2. The strains were cultured in 250 ml Erlenmeyer flasks containing 100 ml of Z8 medium (Kotai 1972), except for the N<sub>2</sub> fixing *Anabaena* and *Aphanizomenon*, which were cultivated in Z8X (without nitrogen). The strains were cultured under controlled laboratory conditions (25°C and illumination of 30 µmol/m/s with a photoperiod of 16/8 h day/night). All experiments were performed in triplicate batch cultures. The cultures were sampled after 27 days of culture, during their logarithmic growth phase. For each culture, a double filtration was performed: 100 ml of each culture sample was first filtered through an 1.2 µm pore-size filter membrane (Isopore Membrane Filters, Millipore) and then 20 ml of this filtrate was used for a Biolog EcoPlate experiment; 80 ml was aseptically filtered through 0.2 µm pore-size filters (Track-Etched Membranes, Whatman® Nuclepore™). These filters were stored at -20°C for further molecular analyses. The environmental cyanobacteria were collected from a recreation lake located near the city of Champs-sur-Marne (France, 48°51'47.0 N, 02°35'53.9 E) in 2012. Two cyanobacterial genera bloomed during the summer season (*Anabaena* in July and *Microcystis* in September), and they were sampled as previously described (Pascualt et al. 2014). The cultivated *Microcystis* strain M5 (Table II. 2.) used in this study was also isolated at the same time.

**Table II. 2.: Characteristics of the cyanobacterial strains and environmental samples used in this study**

Strain code	Strain number	Genus / Species	Origin	Input date in PMC	Toxins production	Culture media	OD <sub>665</sub> (nm)
Ana1	PMC 207.03	<i>Anabaena flos-aquae</i>	Senegal	2003	Anatoxin-a	Z8X	0.0917
Ana2	PMC 200.03	<i>Anabaena planctonica</i>	Senegal	2003	Non toxic	Z8X	0.0849
Ana3	PMC 624.10	<i>Anabaena planctonica</i>	Champs-sur-Marne, France	2010	Non toxic	Z8X	0.0260
Aph1	PMC 635.10	<i>Aphanizomenon gracile</i>	Champs-sur-Marne, France	2010	STX	Z8X	0.1169
Aph2	PMC 644.10	<i>Aphanizomenon gracile</i>	Champs-sur-Marne, France	2010	Non toxic	Z8X	0.1813
M1	PMC 155.02	<i>Microcystis aeruginosa</i>	Senegal	2002	Non toxic	Z8	0.0826
M2	PMC 250.05	<i>Microcystis aeruginosa</i>	Burkina Faso	2005	Non toxic	Z8	0.0941
M3	PMC 728.11	<i>Microcystis</i>	Valence, France	2011	MC	Z8	0.0897
M4	PMC 568.08	<i>Microcystis</i>	Champs-sur-Marne, France	2008	Undetermined	Z8	0.0396
M5	PMC 828.12	<i>Microcystis</i>	Champs-sur-Marne, France	2012	MC	Z8	0.0578
P1	PMC 75.02	<i>Planktothrix agardhii</i>	NBV, France	2002	MC	Z8	0.1811
P2	PMC 101.02	<i>Planktothrix agardhii</i>	NBV, France	2002	Non toxic	Z8	0.0468
P3	PMC 427.08	<i>Planktothrix agardhii</i>	Enghien, France	2008	Non toxic	Z8	0.1400
P4	PMC 255.05	<i>Planktothrix agardhii</i>	Burkina Faso	2005	Non toxic	Z8	0.0784
P5	PMC 686.10	<i>Planktothrix agardhii</i>	Tunisie	2010	Non toxic	Z8	0.0618
Env_Ana	Environmental bloom	<i>Anabaena</i>	Champs-sur-Marne, France	2012	Undetermined	-	-
Env_M	Environmental bloom	<i>Microcystis</i>	Champs-sur-Marne, France	2012	Undetermined	-	-

## Carbon-source utilization

The Biolog EcoPlate experiment uses 96-well microtiter plates containing a total of 31 carbon sources and a blank with only water, all in triplicates. In addition to the carbon source, each well contains the redox agent tetrazolium violet to indicate the oxidation of the substrates. Positive wells develop a purple color that can be quantified spectrophotometrically. Each well was inoculated with 150  $\mu$ L of sample and the plates were then incubated at 25°C for one week. During the incubation, the absorbance of the plates was measured every day at a wavelength of 590 nm using a spectrophotometric microplate reader (Molecular Devices, USA). The optical density in each well was averaged between technical replicates and between cultural



triplicates. Carbon metabolic activity of the bacterial communities was thus analyzed for all the 31 carbon sources using a principal component analysis (PCA). For each bacterial community associated with the different cyanobacterial strains, microbial activity was also expressed as the average well-color development (AWCD) determined as follows:  $AWCD = \sum OD_i / 31$ , where  $OD_i$  is the mean optical density value from each well. Carbon metabolic richness, as the number of oxidized carbon substrates, was calculated using an OD of 0.25 as the threshold for a positive response (Garland 1996). The nitrogen use index was calculated and expressed as the ratio of total substrate utilization to substrates that contain nitrogen (Sala et al. 2006).

### **DNA extraction**

The DNA extraction procedure was based on mechanical and chemical extraction and was adapted from the procedure described in Massana et al. (1997). Each 0.2 µm filter was resuspended in 1.1 ml of lysis buffer (40 mM EDTA, 50 mM Tris-HCl, 0.75 M sucrose) and crushed using Lysing Matrix E tubes in a Fast Prep (MP Biomedical, Fast Prep Instrument® 24). In addition, an enzymatic lysis was performed by adding lysozyme (0.5 mg/mL). After 45 minutes at 37°C, deproteinization was carried out by bringing the mixture to a final concentration of 10% sodium dodecyl sulphate (SDS) and adding proteinase K (0.2 mg/mL, Thermo Scientific) for 1.5 h at 55°C. Then, samples were centrifuged and the supernatant was collected and purified, with phenol-chloroform-isoamyl alcohol followed by chloroform. After precipitating with 0.1 sample volume of sodium acetate and 0.6 sample volume of isopropanol, the nucleic acids were washed with 80% ethanol, and re-suspended in 100 µL of ultrapure water. The samples were finally stored at -20°C.

### **PCR and pyrosequencing**

A region of the 16S rRNA gene including the variable region V3-V4 was selected for tag pyrosequencing. This region was amplified using the bacterial forward primer 563F (Claesson et al. 2010), which also included the Roche 454 pyrosequencing adapter FLX A and a unique 10 bp barcode. The bacterial reverse primer 907rm (Schauer et al. 2003) was also used and included the Roche 454 pyrosequencing adapter FLX B adaptor. Polymerase chain reactions (PCR) were performed under the following conditions: 98°C for 2 min; 30 cycles of 98°C for 10 sec, 52°C for 30 sec and 72°C for 1 min; 72°C for 10 min. Each DNA extract was

amplified by two replicate PCR reactions, which were then pooled. These PCR products were then purified using the MinElute Gel extraction kit (Qiagen, Venlo, Pays-Bas). The amount of DNA in each sample was quantified using the Qubit dsDNA HS assay (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Finally, the PCR products were combined in equimolar amounts and sequenced using the Genome Sequencer GS FLX Titanium 454 of GATC Biotech (Roche Company Branford, CT, USA).

### **Bioinformatics analysis**

The 454 pyrosequencing of the 16S rRNA gene produced 514,905 raw sequences. All sequences were cleaned by applying PANGEA trimming (Giongo et al. 2010) with a quality threshold ( $>23$ ) and a minimum sequence length of 270 bp and by removing sequences with errors in the forward primer. The remaining sequences were clustered using USEARCH (Edgar 2010) at a 97% similarity threshold and were then grouped according to different taxonomic levels using the SILVA base (Pruesse et al. 2007). The process was automated by the PANAM software (<http://code.google.com/p/panamphylogeneticannotation/>), which constructs phylogenetic trees for taxonomic annotation (Taib et al. 2013). After the removal of low-quality sequences, a range of 2,127 to 17,266 sequences were obtained for each bacterial community associated with the different triplicates of cyanobacterial strains. After removing the cyanobacterial sequences, from 1,010 to 16,843 sequences were retrieved per sample. For further analyses, triplicates were pooled and normalized to obtain 4,284 sequences for each BC associated with cyanobacteria. Within the 72,828 sequences analyzed (4,284 sequences per pooled sample), a total of 1,524 OTU were obtained from the cyanobacteria-associated BC in culture and 2,012 OTU were obtained from combined analyses of cyanobacteria-associated BC in cultures and those from the two natural bloom samples. Thresholds for OTU were defined by an abundance of reads  $> 1\%$  within a pooled sample corresponding to abundant OTU, whereas a proportion  $< 0.01\%$  represented rare OTU, as described in Galand et al. (2009) and Pedrós-Alió (2006).

### **Statistical analyses**

All statistical analyses were performed using the statistical software package R 2.15.1 (R Development Core Team 2014). Only differences significant at  $p < 0.05$  were considered. The principal component analysis (PCA) and co-inertia analysis were performed using the Ade4TkGUI software (Thioulouse & Dray 2007). A Hellinger transformation had previously been performed on 454-pyrosequencing

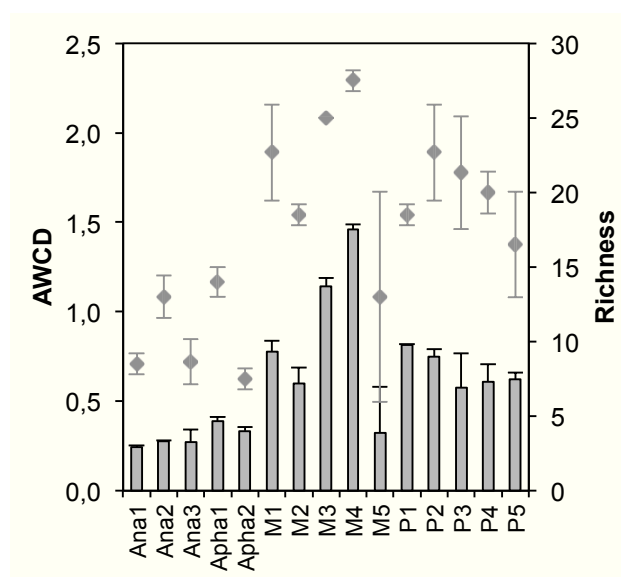
data using the package *vegan* (Dixon 2003). Permutational Multivariate ANOVA (PERMANOVA) and Mantel tests were performed using *vegan* package to test for differences in BC among the different cyanobacterial genus and between BC associated with the  $N_2+$  cyanobacteria and those associated with  $N_2-$  cyanobacteria. To test the potential effects of the different cyanobacterial strains' characteristics (genus, sampling data, sample origin), we first chose the best model by AIC in a Stepwise Algorithm using the "step" function in R and we then calculated type-II analysis-of-variance tables on the three first PCA axes. Diversity indices were calculated using the package *vegan* on the normalized data set (Dixon 2003).

For the Ecoplate analyses, AWCD, carbon metabolic richness, carbon metabolic diversity and diversity indices were analyzed using a pairwise comparisons Kruskal-Wallis test with a Bonferroni correction.

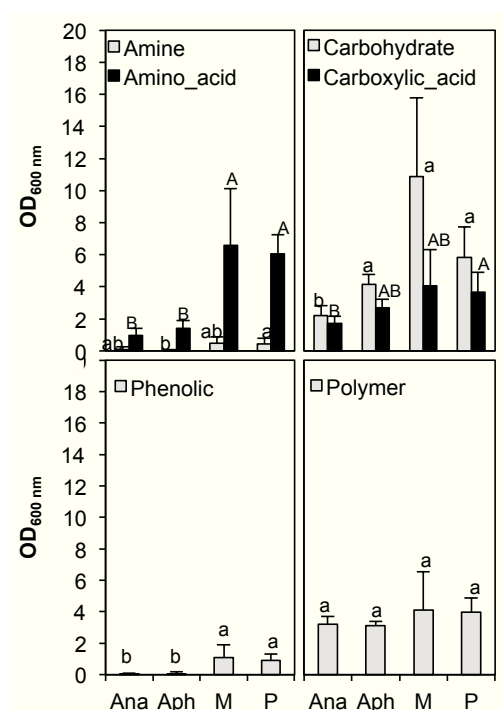
### **Acknowledgements**

This study was funded by the PHYCOCYANO project in the Jeunes Chercheurs-Jeunes Chercheuses program of the French ANR (Agence Nationale de la Recherche; ANR-11- JSV7-014-01). The English text has been checked by a Language Editing Society.

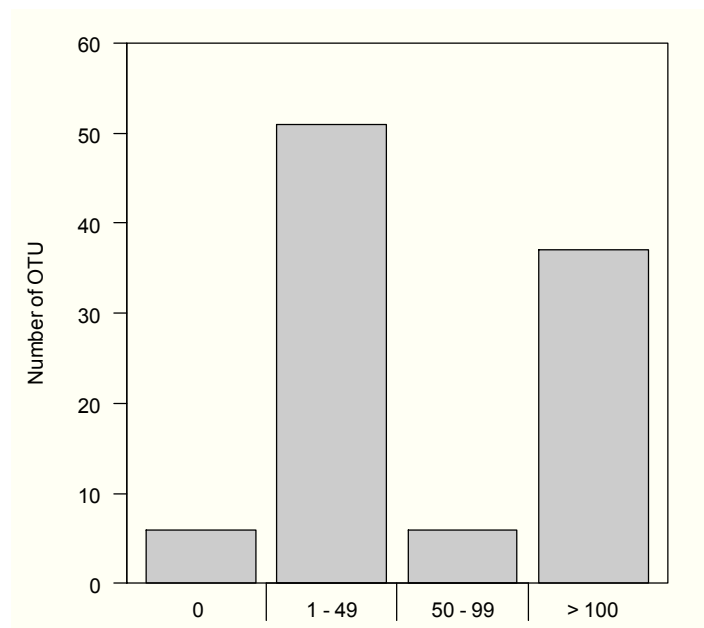
## Supporting Information



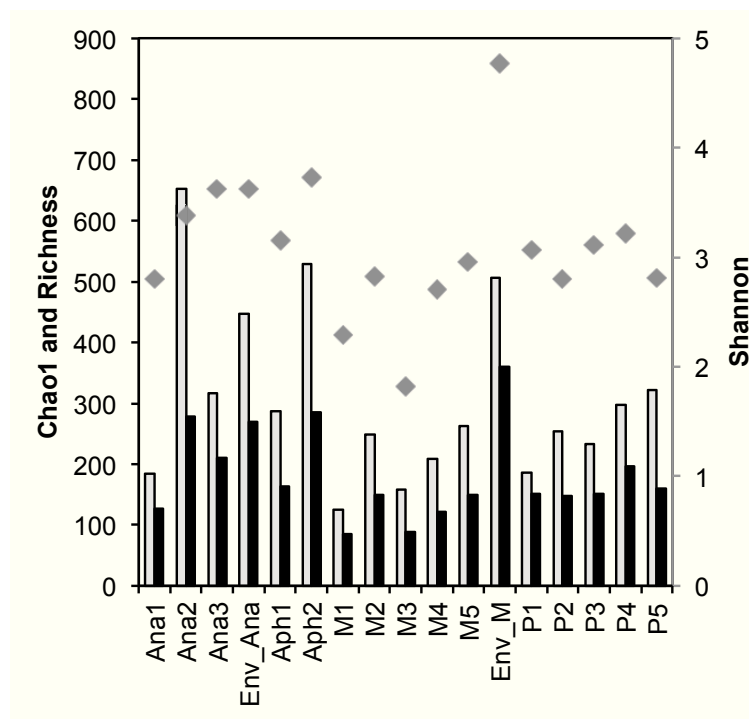
**Figure II. S 1 : Comparative use of the 31 carbon substrates in the Biolog plates by the bacterial communities associated with all the cyanobacterial strains in culture.** Abbreviations: Ana: *Anabaena* strains; Aph: *Aphanizomenon* strains; M: *Microcystis* strains; P: *Planktothrix* strains; AWCD: Average well-color development (histograms)



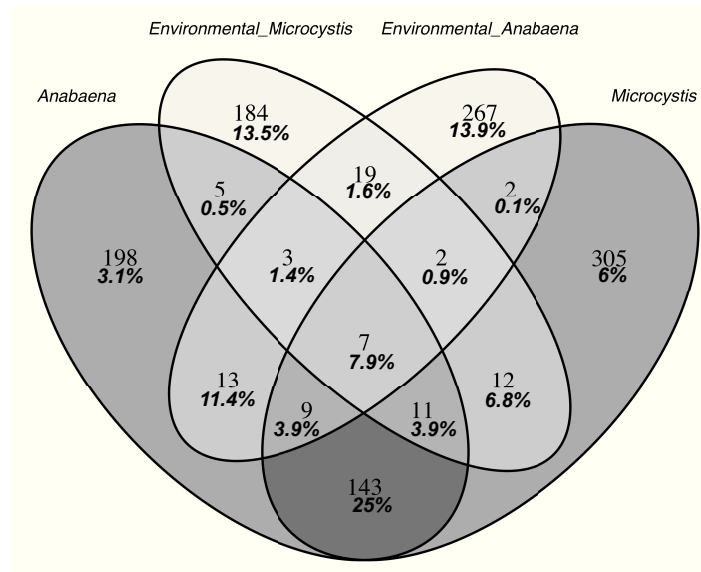
**Figure II. S 2.: Comparative use of the different families of carbon substrates in the Biolog plates by the bacterial communities associated with cyanobacterial strains in culture belonging to four genera.** Abbreviations: Ana: *Anabaena* strains; Aph: *Aphanizomenon* strains; M: *Microcystis* strains; P: *Planktothrix* strains; AWCD: Average well-color development (histograms)



**Figure II. S 3.: Distribution of 100 most abundant OTU identified in our study as a function of the number of sequences that were matched with at least a 98% sequence identity in GeneBank™**



**Figure II. S 4.: Richness (black histograms), Chao 1 (grey histograms) and Shannon (diamonds) values estimated in the bacterial communities associated with all cyanobacterial strains in culture and with the two natural bloom samples.** Abbreviations: Ana: *Anabaena* strains; Aph: *Aphanizomenon* strains; M: *Microcystis* strains; P: *Planktothrix* strains; Env-Ana: Environmental sample of an *Anabaena* bloom; Env-M: Environmental sample of a *Microcystis* bloom



**Figure II. S 5.:** Venn diagram showing the distribution of all the bacterial OTU found in BC associated with *Anabaena* and *Microcystis* strains in culture and in environmental blooms, after normalization to the smallest sample ( $n=11002$ ). The percentages of reads contained by these OTU are shown in bold italic.

**Table II. S 1.:** Description of the results of the BLAST analysis performed on the 100 most abundant OTU found in BC associated with cyanobacteria in culture. (See Annexe 5)



## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Alazard D** (1990) Nitrogen fixation in pure culture by rhizobia isolated from stem nodules of tropical *Aeschynomene* species. *FEMS Microbiol Lett* **68**:177–182
- Amann R, Ludwig W** (2000) Ribosomal RNA-targeted nucleic acid probes for studies in microbial ecology. *FEMS Microbiol Rev* **24**:555–565
- Amann RI, Ludwig W, Schleifer KH** (1995) Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiol Rev* **59**:143–69
- Bagatini IL, Eiler A, Bertilsson S, Klaveness D, Tessarolli LP, Vieira AAH** (2014) Host-specificity and dynamics in bacterial communities associated with bloom-forming freshwater phytoplankton. *PLoS One* **9**:e85950
- Becker JW, Berube PM, Follett CL, Waterbury JB, Chisholm SW, DeLong EF, Repeta DJ** (2014) Closely related phytoplankton species produce similar suites of dissolved organic matter. *Front Microbiol* **5**:1–14
- Bell W, Mitchell R** (1972) Chemotactic and growth responses of marine bacteria to algal extracellular products. *Biol Bull* **143**:265–277
- Berg KA, Lyra C, Sivonen K, Paulin L, Suomalainen S, Tuomi P, Rapala J** (2009) High diversity of cultivable heterotrophic bacteria in association with cyanobacterial water blooms. *ISME J* **3**:314–325
- Bomo AM, Tryland I, Haande S, Hagman CHC, Utkilen H** (2011) The impact of cyanobacteria on growth and death of opportunistic pathogenic bacteria. *Water Sci Technol* **64**:384–390
- Buchan A, LeClerc GR, Gulvik CA, González JM** (2014) Master recyclers: features and functions of bacteria associated with phytoplankton blooms. *Nat Rev Microbiol* **12**:686–698
- Cai H, Jiang H, Krumholz LR, Yang Z** (2014) Bacterial Community Composition of Size-Fractioned Aggregates within the Phycosphere of Cyanobacterial Blooms in a Eutrophic Freshwater Lake. *PLoS One* **9**:e102879
- Cai H, Yan Z, Wang A, Krumholz LR, Jiang HL** (2013) Analysis of the attached microbial community on mucilaginous cyanobacterial aggregates in the eutrophic Lake Taihu reveals the importance of Planctomycetes. *Microb Ecol* **66**:73–83
- Caldwell Eldridge SL, Wood TM, Echols KR, Topping BR** (2013) Microcystins, nutrient dynamics, and other environmental factors during blooms of non-microcystin-producing *Aphanizomenon flos-aquae* in Upper Klamath Lake, Oregon, 2009. *Lake Reserv Manag* **29**:68–81
- Carey CC, Ibelings BW, Hoffmann EP, Hamilton DP, Brookes JD** (2012) Eco-physiological adaptations that favour freshwater cyanobacteria in a changing climate. *Water Res* **46**:1394–1407
- Chen H, Boutros PC** (2011) VennDiagram: a package for the generation of highly-customizable Venn and Euler diagrams in R. *BMC Bioinformatics* **12**:35
- Choi KH, Dobbs FC** (1999) Comparison of two kinds of Biolog microplates (GN and ECO) in their ability to distinguish among aquatic microbial communities. *J Microbiol Methods* **36**:203–213



- Claesson MJ, Wang Q, O'Sullivan O, Greene-Diniz R, Cole JR, Ross RP, O'Toole PW** (2010) Comparison of two next-generation sequencing technologies for resolving highly complex microbiota composition using tandem variable 16S rRNA gene regions. *Nucleic Acids Res* **38**:e200
- Debroas D, Humbert JF, Enault F, Bronner G, Faubladier M, Cornillot E** (2009) Metagenomic approach studying the taxonomic and functional diversity of the bacterial community in a mesotrophic lake (Lac du Bourget--France). *Environ Microbiol* **11**:2412–24
- Dixon P** (2003) VEGAN, a package of R functions for community ecology. *J Veg Sci* **14**:927–930
- Dodds WK, Bouska WW, Eitzmann JL, Pilger TJ, Pitts KL, Riley AJ, Schloesser JT, Thornbrugh DJ** (2009) Eutrophication of U.S. freshwaters: analysis of potential economic damages. *Environ Sci Technol* **43**:12–19
- Dreyfus BL, Elmerich C, Dommergues YR** (1983) Free-Living *Rhizobium* Strain Able To Grow on N<sub>2</sub> as the Sole Nitrogen Source. *Appl Environ Microbiol* **45**:711–713
- Dziallas C, Grossart HP** (2011) Temperature and biotic factors influence bacterial communities associated with the cyanobacterium *Microcystis* sp. *Environ Microbiol* **13**:1632–41
- Eddy SR** (1998) Profile hidden Markov models. *Bioinformatics* **14**:755–763
- Edgar RC** (2010) Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST. *Bioinformatics* **26**:2460–2461
- Edgar RC, Haas BJ, Clemente JC, Quince C, Knight R** (2011) UCHIME improves sensitivity and speed of chimera detection. *Bioinformatics* **27**:2194–2200
- Eiler A, Bertilsson S** (2004) Composition of freshwater bacterial communities associated with cyanobacterial blooms in four Swedish lakes. *Environ Microbiol* **6**:1228–43
- Galand PE, Casamayor EO, Kirchman DL, Lovejoy C** (2009) Ecology of the rare microbial biosphere of the Arctic Ocean. *Proc Natl Acad Sci USA* **106**:22427–22432
- Garland JL** (1996) Analytical approaches to the characterization of samples of microbial communities using patterns of potential C source utilization. *Soil Biol Biochem* **28**:213–221
- Ghai R, Mizuno CM, Picazo A, Camacho A** (2014) Key roles for freshwater Actinobacteria revealed by deep metagenomic sequencing. *Mol Ecol* **23**:6073–6090
- Giongo A, Crabb DB, Davis-Richardson AG, Chauliac D, Mobberley JM, Gano KA, Mukherjee N, Casella G, Roesch LFW, Walts B, Riva A, King G, Triplett EW** (2010) PANGEA: pipeline for analysis of next generation amplicons. *ISME J* **4**:852–61
- Gomez-Alvarez V, Teal TK, Schmidt TM** (2009) Systematic artifacts in metagenomes from complex microbial communities. *ISME J* **3**:1314–7
- Grossart HP, Frindte K, Dziallas C, Eckert W, Tang KW** (2011) Microbial methane production in oxygenated water column of an oligotrophic lake. *Proc Natl Acad Sci USA* **108**:19657–61
- Gumbo JR, Colet TE** (2011) Light and electron microscope assessment of the lytic activity of *Bacillus* on *Microcystis aeruginosa*. *african J Biotechnol* **10**:8054–8063
- Haukka K, Kolmonen E, Hyder R, Hietala J, Vakkilainen K, Kairesalo T, Haario H, Sivonen K** (2006) Effect of nutrient loading on bacterioplankton community composition in lake mesocosms. *Microb Ecol* **51**:137–46

- Hee-jin C, Baik-ho K, Jeong-dong K, Myung-soo H** (2005) *Streptomyces neyagawaensis* as a control for the hazardous biomass of *Microcystis aeruginosa* (Cyanobacteria) in eutrophic freshwaters. *Biol Control* **33**:335–343
- Hietanen S, Lehtimäki J, Tuominen L, Sivonen K, Kuparinen J** (2002a) *Nodularia* spp. (Cyanobacteria) incorporate leucine but not thymidine: importance for bacterial-production measurements. *Aquat Microb Ecol* **28**:99–104
- Hietanen S, Moisander P, Kuparinen J, Tuominen L** (2002b) No sign of denitrification in a Baltic Sea cyanobacterial bloom. *Mar Ecol Prog Ser* **242**:73–82
- Hodkinson BP, Lutzoni F** (2010) A microbiotic survey of lichen-associated bacteria reveals a new lineage from the *Rhizobiales*. *Symbiosis* **49**:163–180
- Humbert JF, Dorigo U, Cecchi P, Le Berre B, Debroas D, Bouvy M** (2009) Comparison of the structure and composition of bacterial communities from temperate and tropical freshwater ecosystems. *Environ Microbiol* **11**:2339–50
- Jiang L, Yang L, Xiao L, Shi X, Gao G, Qin B** (2007) Quantitative studies on phosphorus transference occurring between *Microcystis aeruginosa* and its attached bacterium (*Pseudomonas* sp.). *Hydrobiologia* **581**:161–165
- Kapustina LL** (2006) Experimental study of *Microcystis*-associated and free-living bacteria. *Microbiology* **75**:606–610
- Kolzau S, Wiedner C, Rücker J, Köhler J, Köhler A, Dolman AM** (2014) Seasonal patterns of Nitrogen and Phosphorus limitation in four German Lakes and the predictability of limitation status from ambient nutrient concentrations. *PLoS One* **9**(4): e96065
- Kotai J** (1972) Instructions for preparation of modified nutrient solution Z8 for algae. Norw Inst Water Res Oslo:11–5
- Kolmonen E, Sivonen K, Rapala J, Haukka K** (2004) Diversity of cyanobacteria and heterotrophic bacteria in cyanobacterial blooms in Lake Joutikas, Finland. *Aquat Microb Ecol* **36**:201–211
- Landa M, Cottrell MT, Kirchman DL, Kaiser K, Medeiros PM, Tremblay L, Batailler N, Caparros J, Catala P, Escoubeyrou K, Oriol L, Blain S, Obernosterer I** (2014) Phylogenetic and structural response of heterotrophic bacteria to dissolved organic matter of different chemical composition in a continuous culture study. *Environ Microbiol* **16**:1668–1681
- Lane D** (1991) 16S/23S rRNA sequencing. *Nucleic Acid Tech Bact Syst*:125–175
- Leloup M, Nicolau R, Pallier V, Yéprémian C, Feuillade-Cathalifaud G** (2013) Organic matter produced by algae and cyanobacteria: Quantitative and qualitative characterization. *J Environ Sci (China)* **25**:1089–1097
- Li H, Xing P, Wu QL** (2012) Characterization of the bacterial community composition in a hypoxic zone induced by *Microcystis* blooms in Lake Taihu, China. *FEMS Microbiol Ecol* **79**:773–784
- Ludwig RA** (1984) *Rhizobium* free-living nitrogen fixation occurs in specialized nongrowing cells. *Proc Natl Acad Sci USA* **81**:1566–1569
- Luo S, Kang HS, Kronic A, Chlipala GE, Cai G, Chen W, Franzblau SG, Swanson SM, Orjala J** (2014) Carbamidocyclophanes F and G with Anti-Mycobacterium tuberculosis Activity from the Cultured Freshwater Cyanobacterium *Nostoc* sp. *Tetrahedron Lett* **55**:686–689

- MacLean D, Jones JDG, Studholme DJ** (2009) Application of “next-generation” sequencing technologies to microbial genetics. *Nat Rev Micro* **7**:287–296
- Maruyama T, Kato K, Park HD** (2004) Population Dynamics of Free-Living Bacteria Related to the Microcystin-Degrading Strain Y2 in Lake Suwa and in Microcystin Amended Enrichments. *Microbes Environ* **19**:137–146
- Massana R, Murray a E, Preston CM, DeLong EF** (1997) Vertical distribution and phylogenetic characterization of marine planktonic Archaea in the Santa Barbara Channel. *Appl Environ Microbiol* **63**:50–6
- Meneghin J** (2011) The Aquificales data Warehouse, Bioinformatics Tools.
- Mischler JA, Taylor PG, Townsend AR** (2014) Nitrogen limitation of pond ecosystems on the plains of Eastern Colorado. *PLoS One* **9** (5): e95757
- Newton RJ, Jones SE, Eiler A, McMahon KD, Bertilsson S** (2011) A guide to the natural history of freshwater lake bacteria. *Microbiol Mol Biol Rev.* **75**:14-49
- Niemi RM, Heiskanen I, Heine R, Rapala J** (2009) Previously uncultured  $\beta$ -Proteobacteria dominate in biologically active granular activated carbon (BAC) filters. *Water Res* **43**:5075–5086
- Olsen S, Cole C, Watanabe F, Dean L** (1954) Estimation of available phosphorus in soils by extraction with sodium bicarbonate. Washington, D.C. : U.S. Dept. of Agriculture
- Paerl HW** (1978) Role of heterotrophic bacteria in promoting  $N_2$  fixation by *Anabaena* in aquatic habitats. *Microb Ecol* **4**:215–231
- Paerl HW, Huisman J** (2008) Blooms like it hot. *Science* **320**:57–58
- Paerl HW, Pinckney JL, Steppe TF** (2000) Cyanobacterial-bacterial mat consortia: Examining the functional unit of microbial survival and growth in extreme environments. *Environ Microbiol* **2**:11–26
- Parveen B, Mary I, Vellet A, Ravet V, Debroas D** (2013b) Temporal dynamics and phylogenetic diversity of free-living and particle-associated Verrucomicrobia communities in relation to environmental variables in a mesotrophic lake. *FEMS Microbiol Ecol* **83**:189–201
- Parveen B, Ravet V, Djediat C, Mary I, Quiblier C, Debroas D, Humbert JF** (2013a) Bacterial communities associated with *Microcystis* colonies differ from free-living communities living in the same ecosystem. *Environ Microbiol Rep* **5**:716–724
- Pascualt N, Loux V, Derozier S, Martin V, Debroas D, Maloufi S, Humbert JF, Leloup J** (2014) Technical challenges in metatranscriptomic studies applied to the bacterial communities of freshwater ecosystems. *Genetica*:157–167
- Pedrós-Alió C** (2006) Marine microbial diversity: can it be determined? *Trends Microbiol* **14**:257–63
- Ploug H** (2008) Cyanobacterial surface blooms formed by *Aphanizomenon sp.* and *Nodularia spumigena* in the Baltic Sea: Small-scale fluxes, pH, and oxygen microenvironments. *Limnol Oceanogr* **53**:914–921
- Ploug H, Adam B, Musat N, Kalvelage T, Lavik G, Wolf-Gladrow D, Kuypers MMM** (2011) Carbon, nitrogen and  $O_2$  fluxes associated with the cyanobacterium *Nodularia spumigena* in the Baltic Sea. *ISME J* **5**:1549–58

- Ploug H, Musat N, Adam B, Moraru CL, Lavik G, Vagner T, Bergman B, Kuypers MMM** (2010) Carbon and nitrogen fluxes associated with the cyanobacterium *Aphanizomenon* sp. in the Baltic Sea. *ISME J* **4**:1215–23
- Price MN, Dehal PS, Arkin AP** (2010) FastTree 2--approximately maximum-likelihood trees for large alignments. *PLoS One* **5**:e9490
- Pruesse E, Quast C, Knittel K, Fuchs BM, Ludwig W, Peplies J, Glöckner FO** (2007) SILVA: A comprehensive online resource for quality checked and aligned ribosomal RNA sequence data compatible with ARB. *Nucleic Acids Res* **35**:7188–7196
- Quast C, Pruesse E, Yilmaz P, Gerken J, Schweer T, Yarza P, Peplies J, Glöckner FO** (2013) The SILVA ribosomal RNA gene database project: Improved data processing and web-based tools. *Nucleic Acids Res* **41**:590–596
- R Development Core Team** (2014) R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0. URL: <https://www.r-project.org/>.
- Renaud F, Pringault O, Rochelle-Newall E** (2005) Effects of the colonial cyanobacterium *Trichodesmium* spp. on bacterial activity. *Aquat Microb Ecol* **41**:261–270
- Sala M, Estrada M, Gasol J** (2006) Seasonal changes in the functional diversity of bacterioplankton in contrasting coastal environments of the NW Mediterranean. *Aquat Microb Ecol* **44**:1–9
- Sarmiento H, Gasol JM** (2012) Use of phytoplankton-derived dissolved organic carbon by different types of bacterioplankton. *Environ Microbiol* **14**:2348–60
- Schauer M, Balagué V, Pedrós-Alió C, Massana R** (2003) Seasonal changes in the taxonomic composition of bacterioplankton in a coastal oligotrophic system. *Aquat Microb Ecol* **31**:163–174
- Shao K, Zhang L, Wang Y, Yao X, Tang X, Qin B, Gao G** (2014) The responses of the taxa composition of particle-attached bacterial community to the decomposition of *Microcystis* blooms. *Sci Total Environ* **488-489**:236–242
- Shen H, Niu Y, Xie P, Tao M, Yang X** (2011) Morphological and physiological changes in *Microcystis aeruginosa* as a result of interactions with heterotrophic bacteria. *Freshw Biol* **56**:1065–1080
- Shi L, Cai Y, Kong F, Yu Y** (2011) Changes in abundance and community structure of bacteria associated with buoyant *Microcystis* colonies during the decline of cyanobacterial bloom (autumn–winter transition). *Ann Limnol - Int J Limnol* **47**:355–362
- Shi L, Cai Y, Kong F, Yu Y** (2012) Specific association between bacteria and buoyant *Microcystis* colonies compared with other bulk bacterial communities in the eutrophic Lake Taihu, China. *Environ Microbiol Rep* **4**:669–678
- Shi L, Cai Y, YANG H, Xing P, Li P, KONG L, Kong F** (2009) Phylogenetic diversity and specificity of bacteria associated with *Microcystis aeruginosa* and other cyanobacteria. *J Environ Sci* **21**:1581–1590
- Sime-Ngando T** (2014) Environmental bacteriophages: Viruses of microbes in aquatic ecosystems. *Front Microbiol* **5**:1–14
- Simonato F, Gómez-Pereira PR, Fuchs BM, Amann R** (2010) Bacterioplankton diversity and community composition in the Southern Lagoon of Venice. *Syst Appl Microbiol* **33**:128–138

- Stackebrandt E, Goebel BM** (1994) Taxonomic Note: A Place for DNA-DNA Reassociation and 16S rRNA Sequence Analysis in the Present Species Definition in Bacteriology. *Int J Syst Bacteriol* **44**:846–849
- Stevenson BS, Waterbury JB** (2006) Isolation and identification of an epibiotic bacterium associated with heterocystous *Anabaena* cells. *Biol Bull* **210**:73–7
- Taib N, Mangot JF, Domaizon I, Bronner G, Debroas D** (2013) Phylogenetic Affiliation of SSU rRNA Genes Generated by Massively Parallel Sequencing: New Insights into the Freshwater Protist Diversity. *PLoS One* **8**:e58950
- Thioulouse J, Dray S** (2007) Interactive Multivariate Data Analysis in R with the ade4 and ade4TkGUI Packages. *J Stat Softw* **22**:1–14
- Tuomainen JM, Hietanen S, Kuparinen J, Martikainen PJ, Servomaa K** (2003) Baltic Sea cyanobacterial bloom contains denitrification and nitrification genes, but has negligible denitrification activity. *FEMS Microbiol Ecol* **45**:83–96
- Urakawa H, Ali J, Ketover RDJ, Talmage SD, Garcia JC, Campbell IS, Loh AN, Parsons ML** (2013) Shifts of Bacterioplankton Metabolic Profiles along the Salinity Gradient in a Subtropical Estuary. *ISRN Oceanogr* **2013**:1–12
- Vavrek M.** (2011) fossil: palaeoecological and palaeogeographical analysis tools. *Palaeontol Electron* **14**.
- Warnecke F, Hess M** (2009) A perspective: metatranscriptomics as a tool for the discovery of novel biocatalysts. *J Biotechnol* **142**:91–5
- Wommack KE, Colwell RR** (2000) Virioplankton: viruses in aquatic ecosystems. *Microbiol Mol Biol Rev* **64**:69–114
- Woodhouse JN, Ongley SE, Brown MV., Neilan BA** (2013) Microbial diversity and diazotrophy associated with the freshwater non-heterocyst forming cyanobacterium *Lyngbya robusta*. *J Appl Phycol* **25**:1039–1045
- Worm J, Gustavson K, Garde K, Henrik Borch N, Søndergaard M** (2001) Functional similarity of attached and free-living bacteria during freshwater phytoplankton blooms. *Aquat Microb Ecol* **25**:103–111
- Worm J, Søndergaard M** (1998) Dynamics of heterotrophic bacteria attached to *Microcystis* spp. (Cyanobacteria). *Aquat Microb Ecol* **14**:19–28
- Yamamoto Y** (2009) Environmental factors that determine the occurrence and seasonal dynamics of *Aphanizomenon flos-aquae*. *J Limnol* **68**:122–132
- Yamamoto Y, Nakahara H** (2009) Seasonal variations in the morphology of bloom-forming cyanobacteria in a eutrophic pond. *Limnology* **10**:185–193
- Zhu L, Wu Y, Song L, Gan N** (2014) Ecological dynamics of toxic *Microcystis* spp. and microcystin-degrading bacteria in Dianchi Lake, China. *Appl Environ Microbiol* **80**:1874–1881
- Zinger L, Gobet A, Pommier T** (2012) Two decades of describing the unseen majority of aquatic microbial diversity. *Mol Ecol* **21**:1878–96
- Zwart G, Crump BC, Agterveld MPK, Hagen F, Han S** (2002) Typical freshwater bacteria: an analysis of available 16S rRNA gene sequences from plankton of lakes and rivers. *Aquat Microb Ecol* **28**:141–155





### **III. GROUPES FONCTIONNELS RESPONSABLES DU RECYCLAGE DE L'AZOTE ASSOCIEES AUX PHYCOSPHERES CYANOBACTERIENNES**

---



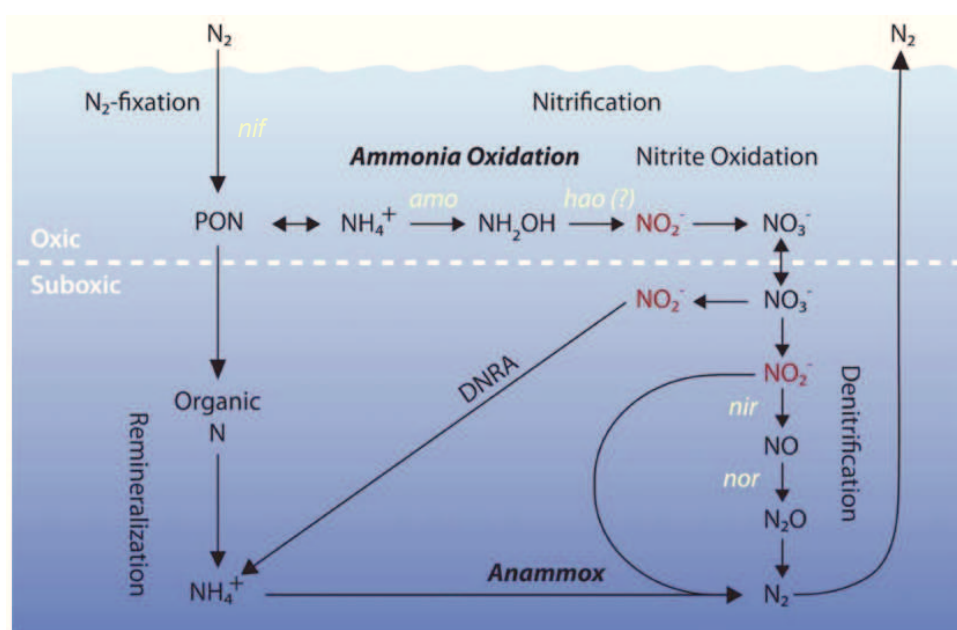


## 1. Introduction

L'azote est un élément essentiel à tous les organismes du fait qu'il est présent dans la constitution des protéines (acides aminés), des acides nucléiques, et divers polymères (pigments...). Comme tout les éléments chimiques, l'azote subit, au sein des écosystèmes, une série de transformations complexes.

### 1.1. Cycle de l'azote dans les milieux aquatiques

Les transformations de l'azote dans les écosystèmes sont principalement réalisées par les activités microbiennes dans des conditions d'oxygène ( $O_2$ ) très différentes allant d'oxiques à anoxiques (Figure III. 1.).



**Figure III. 1.: Transformation de l'azote par les microorganismes dans un écosystème aquatique autour de l'interface oxique et suboxique.** Les gènes intervenant des ces différentes étapes de transformation sont marqué en jaune: *nif* (pour nitrogenase reductase); *amo* (pour ammonia mono-oxygenase); *hao* (pour bacterial hydroxylamine oxidoreductase, le (?) indique que le mécanisme est inconnu chez les archées); *nir* (pour nitrite reductase) et *nor* (pour nitric oxide reductase). Les autres gènes fonctionnels et processus d'assimilation des nitrates/nitrites ne sont pas mentionnés ici. (modifié à partir de Francis et al. 2007).

En milieu aquatique, les «Hot-spot» du recyclage aérobique et anaérobique de l'azote se produit au niveau des interfaces oxiques-anoxiques, comme l'oxycline<sup>12</sup> dans la colonne d'eau ou à la surface des sédiments. Ces zones sont caractérisées par la diminution abrupte du gradient d'oxygène ( $O_2$ ) rendant ainsi possible la

<sup>12</sup> Oxycline : zone d'une colonne d'eau stratifiée où la quantité d'oxygène dissous décroît.

cooccurrence des différentes étapes de transformation de l'azote (Sigee 2005). Ces gradients se produisent également dans des agrégats, notamment ceux formés par les cyanobactéries (Ploug et al. 1997). Certaines études effectuées en milieu marin ont montré que les différentes étapes du cycle de l'azote sont possibles dans les agrégats formés par les cyanobactéries fixatrices d'azote atmosphérique ( $N_2$ ) durant leur prolifération (Klawonn et al. 2015). De plus, il a été démontré que la communauté bactérienne associée à la phycosphère de cyanobactéries fixatrices de  $N_2$  en mer baltique possède les gènes nécessaires à la nitrification et la dénitrification (Tuomainen et al. 2003).

En milieu d'eau douce, plusieurs études se sont intéressées aux différentes étapes du recyclage d'azote mais pas au sein des colonies ou agrégats formés lors des proliférations de cyanobactéries. Notre hypothèse est que les cyanobactéries d'eau douce abritent une communauté bactérienne impliquée dans le recyclage de l'azote. On suppose alors que cette communauté fonctionnelle associée aux cyanobactéries sera différente de celle non associée. On suppose aussi que la capacité ou non des cyanobactéries à fixer le  $N_2$  influencerait la distribution des bactéries responsables des différentes étapes du cycle de l'azote présenté ci-dessus.

#### **1.1.1. Fixation de l'azote**

La fixation biologique de l'azote atmosphérique joue un rôle important dans les écosystèmes aquatiques et terrestres (Vitousek & Howarth 1991). En effet, le  $N_2$  sous sa forme de gaz inerte dans l'atmosphère n'est pas biodisponible pour la plupart des organismes. Seules certaines bactéries et archées (diazotrophes) sont capables de le rendre biodisponible en réduisant le  $N_2$  en azote ammoniacal grâce à la nitrogénase (Zehr et al. 2003a). La nitrogénase est un complexe enzymatique constitué de deux composants: la nitrogénase (Composant I) composée de deux sous-unités  $\alpha$  et de deux sous-unités  $\beta$  codées par les gènes *nifD* et *nifK* respectivement et la nitrogénase réductase (Composant II) composé de deux sous-unités identiques codées par le gène *nifH* (Quinto et al. 1985). Ce dernier gène est utilisé comme marqueur phylogénétique pour l'étude des groupes fixateurs de  $N_2$  (Zehr & McReynolds 1989).

L'importance de la fixation de  $N_2$  en milieu marin (Falkowski 1997) a suscité le développement de méthodes moléculaires propices à la caractérisation des communautés diazotrophes et a permis de démontrer l'impact de la fixation de  $N_2$

par les cyanobactéries et des autres diazotrophes (Zehr, et al. 2003a, Zehr 2011). Ainsi, des études récentes ont révélé la diversité et l'abondance de fixateur de  $N_2$  en milieu marin, notamment des  $\alpha$  (e.g. Moisander et al. 2008) et  $\gamma$ -protéobactéries (e.g. Moisander et al. 2014), avec des taux de fixation aussi élevés que ceux mesurés pour *Trichodesmium spp.* (Falcón et al. 2004).

En milieu d'eau douce, le bactérioplancton fixateur de  $N_2$  restent mal connu et très peu d'étude ont porté sur leur diversité (Zani et al. 2000, MacGregor et al. 2001, Steward et al. 2004, Woodhouse et al. 2013).

### **1.1.2. Nitrification**

La nitrification est le processus d'oxydation de l'ammonium ( $NH_4^+$ ) en nitrite ( $NO_2^-$ ) au cours d'une première étape appelée la nitritation puis du nitrite en nitrate ( $NO_3^-$ ) en une deuxième étape appelée la nitratisation. Ce processus est essentiellement effectué par les bactéries (e.g. *Nitrosomonas sp.* et *Nitrobacter sp.* (Head et al. 1993)) et les archées (Könneke et al. 2005) chimiolithoautotrophes.

La première étape de ce processus repose sur l'activité d'un complexe enzymatique, l'ammonium monooxygénase (AMO), constitué de trois sous unités A, B et C, codées respectivement par les gènes *amoA*, *amoB* et *amoC*. Les gènes *amoA* sont utilisés comme marqueurs phylogénétiques, au même titre que les gènes d'ADNr 16S (Purkhold et al. 2000, Pester et al. 2012). Contrairement aux milieux marins et terrestres, il y a peu d'études qui ont ciblé les gènes *amoA* bactériens (AOB pour ammonia-oxidizing bacteria) et archéens (AOA pour ammonia-oxidizing archaea) dans les milieux d'eaux douces. Néanmoins, ces études ont permis de mettre en évidence l'importante abondance des AOA et leurs variations temporelles (Auguet et al. 2011, Hugoni et al. 2015) et spatiales (Llirós et al. 2010, Auguet et al. 2012) dans ces milieux. Concernant les AOB dans les milieux lacustres, il a été démontré qu'ils sont présents dans les lacs de statuts trophiques allant de tempéré eutrophe, à alpin oligotrophe (Hugoni et al. 2013, Hayden & Beman 2014), mais contrairement aux AOA, l'abondance et la distribution des AOB dans les milieux d'eaux douces reste encore mal connues (Purkhold et al. 2000, Cébron et al. 2004).

### **1.1.3. Dénitrification**

La dénitrification est un processus microbien pendant lequel les composés d'azote oxydés sont utilisés comme accepteurs d'électrons alternatifs à l'oxygène pour la production d'énergie. Ces composés sont réduits successivement en oxyde nitrique (NO), ensuite en oxyde nitreux ( $N_2O$ ) et enfin en  $N_2$  (Philippot 2002).

La capacité à dénitrifier est très largement distribuée au sein de différents groupes taxonomiques de bactéries hétérotrophes anaérobies facultatives (e.g. *Pseudomonas* ou *Bacillus* (Philippot et al. 2007)). La nitrite réductase (Nir) est l'enzyme clé qui catalyse la dénitrification et est codée par deux différents gènes: le gène *nirK* qui code pour la réductase contenant du cuivre et le gène *nirS* qui code pour celle qui contient un cytochrome cd1 (Philippot 2002). Ces deux types d'enzymes ne se retrouvent pas dans la même cellule bactérienne (Zumft 1997) et sont utilisés comme marqueur génétique pour déterminer la diversité de la communauté dénitrifiante dans les écosystèmes d'eau douce (Hallin & Lindgren 1999, Braker et al. 2000).

Dans les milieux lacustres, la dénitrification existe essentiellement dans les sédiments et on observe peu d'activité dénitrifiante dans la colonne d'eau (Seitzinger 1988). Cependant ce processus peut devenir significatif dans les zones où le recyclage des nutriments est très actif et où les matières en suspension sont souvent très concentrées et autorisent la présence de micro-niches anoxiques (Bianchi et al. 1994).

## **1.2. Méthodologie**

Afin de compléter nos premiers travaux sur la diversité structurelle et fonctionnelle des phycosphères cyanobactériennes, nous avons réalisé dans ce chapitre une étude à la fois quantitative et qualitative des groupes fonctionnels impliqués dans le cycle de l'azote associés aux proliférations des cyanobactéries fixatrices et non-fixatrices de  $N_2$  dans l'écosystème étudié.

### **1.2.1. Approche quantitative**

Les trois processus clés du cycle de l'azote présentés ci-dessus: la fixation, la nitrification et la dénitrification ont été ciblés. Le séquençage systématique des gènes responsables de ces étapes conduit aujourd'hui à une vision robuste de la phylogénie de ces groupes fonctionnels. Via l'utilisation de jeux d'amorces spécifiques pour chaque gène on peut étudier le potentiel génétique de ces processus de transformation de l'azote dans un écosystème donné.

Par ailleurs, la PCR quantitative constitue un outil moléculaire efficace dans l'évaluation du rôle de certains microorganismes par le ciblage de gènes fonctionnels et permet de quantifier rapidement un gène d'intérêt dans de nombreux échantillons. Cette technique est maintenant largement appliquée en écologie microbienne pour quantifier l'abondance de gènes marqueurs taxonomiques et fonctionnels de

l'environnement (Smith & Osborn 2009) (Voir Annexe 6 pour le détail de la technique).

Ici, les abondances des bactéries totales (ADNr16S bactérien), archées totales (ADNr16S archéen), bactéries nitrifiantes (AOB, gène *amoA* bactérien), archées nitrifiantes (AOA, gène *amoA* archéen), bactéries dénitrifiantes (gènes *nirK* et *nirS*) et fixateurs de N<sub>2</sub> (*nifH*) ont été évaluées par qPCR pour les proliférations d'*Anabaena* et de *Microcystis* dans leurs fractions associées et libres respectives.

Afin de pouvoir comparer les abondances de gènes entre les différentes fractions et entre les différentes proliférations, le nombre de copies de gène est exprimé en ng d'ADN extrait, plutôt que par volume d'eau filtrée afin de minimiser les biais possibles liés au rendement d'extraction de l'ADN et aux différentes stratégies d'échantillonnage entre les proliférations.

### 1.2.2. Approche qualitative

En milieu marin, *Trichodesmium* et les cyanobactéries symbiotes de diatomées (*Richelia*) ont longtemps été considérées comme les seules diazotrophes importants dans l'océan (Capone 2001). Cependant, des analyses moléculaires ciblant le gène *nifH* ont démontré qu'en milieu marin certains diazotrophes non-cyanobactériens peuvent jouer un rôle important dans la fixation de N<sub>2</sub> dans ces milieux du fait de leur ubiquité et de leur faible variation temporelle (tel que le phylotype γ-24774A11, (Moisander et al. 2014)). Contrairement au milieu marin, très peu de données sont disponibles sur la communauté diazotrophe en milieu lacustre et notamment durant les proliférations de cyanobactéries. On s'est alors particulièrement intéressé à ce groupe fonctionnel durant les proliférations de cyanobactéries.

La diversité structurelle des diazotrophes durant les proliférations des deux cyanobactéries a donc été déterminée, en réalisant une approche exploratoire basée sur le séquençage du gène *nifH* des clones obtenus pour la prolifération d'*Anabaena* et de *Microcystis*.

L'analyse des séquences obtenues s'est faite après nettoyage des séquences en utilisant GeneDoc (Nicholas et al. 1997). Les séquences n'ayant pas la bonne taille et où l'amorce F n'est pas retrouvée sans erreur ont été éliminées du jeu de données. Les séquences nucléotidiques restantes ayant une similarité supérieure ou égale à 98% ont été regroupées. Seule la séquence consensus de ces groupes est alors utilisée pour les analyses ultérieures. Ces séquences ont été analysées en partie via FunGene (Fish et al. 2013). Ce pipeline (disponible sur

<http://fungene.cme.msu.edu/FunGenePipeline/>) propose l'utilisation automatisée des outils tel que USERCH (Edgar et al. 2011) pour l'analyse des séquences chimériques et Frambot (Wang et al. 2013) pour la traduction des séquences nucléotidiques en protéines avec la détection et la correction des décalages de cadre de lecture en utilisant un ensemble de séquences connues. Ces séquences connues ont été obtenues via la base de données du gène *nifH* disponible sur Functional Gene Pipeline and Repository (Version 7.9.1 -- GenBank 207) ([http://fungene.cme.msu.edu/hmm\\_detail.spr?hmm\\_id=328](http://fungene.cme.msu.edu/hmm_detail.spr?hmm_id=328)).

Les séquences protéiques obtenues ont été alignées avec GeneDoc. Un ensemble de séquences protéiques des plus proches représentants cultivés et non cultivés ont été ajoutés à l'alignement. Ces séquences ont été récupérées de deux bases de données différentes du gène *nifH* à savoir Functional Gene Pipeline and Repository du gène *nifH*, aussi que ARB *nifH* database (<http://www.es.ucsc.edu/~wwwzehr/research/database/>). La construction d'arbre phylogénétique s'est faite via MEGA (Tamura et al. 2011, Hall 2013).

## 2. Distribution des groupes fonctionnels responsables du recyclage de l'azote au sein des phycosphères cyanobactériennes des milieux lacustres

### Distribution of nitrogen cycling communities within different bloom forming cyanobacterial genera phycosphere

Imen Louati<sup>1</sup>, Jean-François Humbert<sup>1</sup>, Marie-Anne Barny<sup>1</sup>, Noémie Pascault<sup>1</sup>, Cécile Bernard<sup>2</sup>, Jennifer Tambosco<sup>1</sup> and Julie Leloup<sup>1</sup>

<sup>1</sup>IEES - PARIS, UMR 7618 (UPMC – CNRS – INRA – IRD – UPEC – Paris Diderot), UPMC, Paris, France

<sup>2</sup> MCAM MNHN, UMR CNRS 7245, Muséum National d'Histoire Naturelle, Sorbonne Universités, Paris, France

#### Abstract

To better understanding why cyanobacteria often dominate phytoplankton communities in eutrophic freshwater ecosystems recent studies have looked at the interactions between cyanobacteria and bacteria. The presence of bacteria that are directly attached or immediately adjacent to cyanobacterial cells suggests that intense nutrient exchanges occur between these microorganisms. This is particularly relevant knowing that cyanobacteria can release photosynthesis and nitrogen fixation products that are bioavailable for bacteria processes. In order to determine if there is a specific association between cyanobacteria and nitrogen (N) cycling bacterial and archaeal communities, we used a quantitative polymerase chain reaction to target functional genes encoding the key enzymes of nitrogen fixing (*nifH*), nitrification (*amoA*) and denitrification (*nirS*, *nirK*) processes. We compared cyanobacteria blooms of *Anabaena* (filamentous and N<sub>2</sub>-fixing) and *Microcystis* (colonial and non-N<sub>2</sub> fixing) that occurred successively within the same lake. We revealed that N cycling process could occur within (associated fractions) and around (free-living fractions) bloom with no significant differences between both blooms. Moreover, they are more important in the free-living fractions than in the associated ones, suggesting that the cyanobacterial bloom could be seen as a source of nitrogen substrates to the free-living bacterial communities. By cloning and sequencing *nifH* gene for both bloom we also highlighted the high diversity of non-



cyanobacterial *nifh*-containing bacteria for the non-N<sub>2</sub> fixing cyanobacteria bloom suggesting positive interaction between both groups.

## Introduction

In eutrophic freshwater, excessive loadings of nitrogen (N) and phosphorus (P) have contributed to the increased occurrence of harmful cyanobacterial blooms occurrence (Paerl & Otten 2013). The importance of N loading relative to P loading is actually debated and some authors suggest N<sub>2</sub>-fixing cyanobacteria could replace non-N<sub>2</sub> fixing cyanobacteria once N inputs are reduced, especially if P remains available (Schindler et al. 2008, Paterson et al. 2011). Indeed, some cyanobacteria can metabolically fix N<sub>2</sub> into bioavailable N compounds, which may confer an ecological advantage to those cyanobacterial genera under N-limiting conditions in eutrophic lake (Tilman et al. 1982). However, there is considerable evidence that the N<sub>2</sub>-fixers are not always able to compensate fully for N-deficiency (Ferber et al. 2004, Dolman et al. 2012, Kolzau et al. 2014).

Nevertheless, elevated N levels can occur in cyanobacterial aggregates, as N<sub>2</sub>-fixing cyanobacteria release recently fixed nitrogen into the surrounding water as dissolved organic nitrogen and ammonium ions (NH<sub>4</sub><sup>+</sup>) (Glibert & Bronk 1994, Mulholland et al. 2004, Ploug et al. 2010, 2011). By introducing “new N” into the ecosystem the N<sub>2</sub>-fixing cyanobacteria will not only benefit cyanobacteria but also stimulate the productivity of the whole planktonic community (Mulholland & Capone 2000). Thus, part of the fixed N by cyanobacteria could also potentially benefit to the surrounding bacteria, especially those involved in the N recycling (Capone et al. 1994). Moreover, previous studies have indicated that the cyanobacterial phycosphere, i.e. the microhabitat where bacteria could be attracted by cyanobacteria (see Bell & Mitchell (1972)), supported an active microbial community different from the free-living one (e.g. Paerl 1978, Worm & Søndergaard 1998, Parveen et al. 2013).

These interactions might be mutualistic and are based on the cyanobacteria providing heterotrophic bacteria a source of labile substrates, while the heterotrophic bacteria provide cyanobacteria with a source of remineralised nutrients. These interactions might be important for the cyanobacterial fitness (Paerl 1978, Shen et al. 2011). Moreover, Klawonn et al. (2015) recently showed that N<sub>2</sub> fixation, ammonification, nitrification, nitrate reduction to ammonium and denitrification could

co-occur within these consortia and that *Nodularia spumigena* aggregates are potential sites of N gain, recycling and loss. The presence of nitrifiers as well as key genes for nitrification (*amoA*) and denitrification (*nirS*, *nirK*) have been demonstrated during *Nodularia spumigena* bloom in Baltic Sea (Tuomainen et al. 2003, 2006). The phycosphere might therefore represent a “Hot spot” of nutrient exchange (Worm & Søndergaard 1998) particularly as regards N cycling. Nevertheless, and despite recent work in this area, less is known about the distribution of these functional groups within cyanobacterial phycosphere in freshwater ecosystems.

We hypothesized that the ability of cyanobacteria to fix or not the N<sub>2</sub> has a strong influence on the composition of their associated bacterial communities, including those responsible for the N cycle in freshwater ecosystem, due to possible strong interactions between them in terms of nutrients supply. We therefore investigated whether bacteria associated with a cyanobacterial bloom in eutrophic lake have genetic potential for nitrogen transformation processes. A quantitative analysis was performed using qPCR approach targeting the functional genes of the key enzymes for nitrogen fixing (*nifH*), nitrification (*amoA*) and denitrification (*nirS* and *nirK*) of the free-living and the associated bacterial communities with two cyanobacterial blooms (N<sub>2</sub>-fixing *Anabaena* sp. and no-N<sub>2</sub>-fixing *Microcystis* sp.) that occurred successively within the same eutrophic lake.

In addition, to better understand the relative contribution of *nifH* gene-containing cyanobacteria and heterotrophic bacteria to the N cycle in eutrophic lake during the cyanobacterial blooms, we investigated the diversity of *nifH* during both N<sub>2</sub> fixing and non-N<sub>2</sub> fixing blooms.

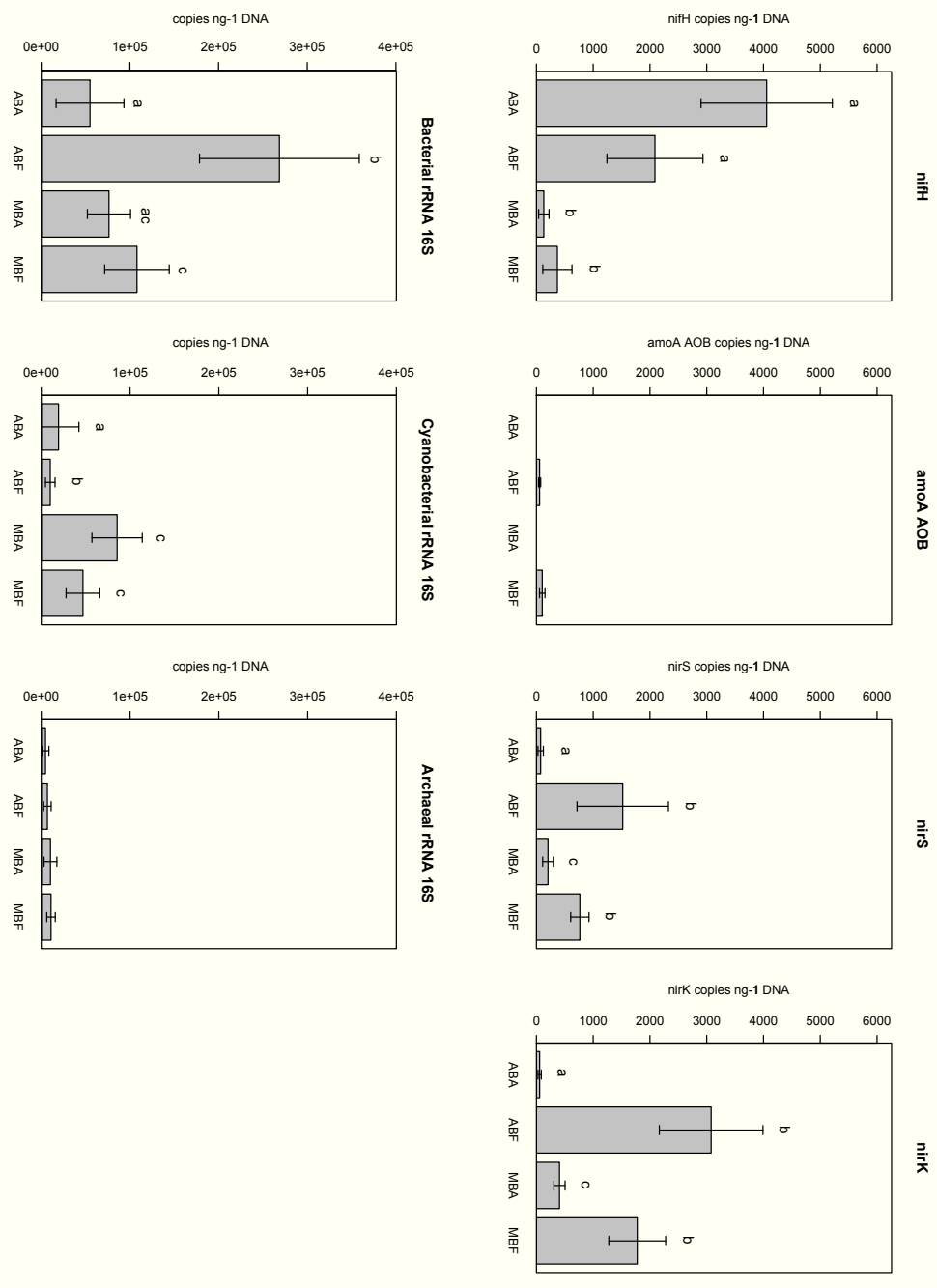
## **Results and discussion**

### **Archaeal and bacterial abundance in *Anabaena* and *Microcystis* phycosphere**

Due to differences in cell size and shape of colonies between the two cyanobacterial genera gene copy numbers we normalized to the amount of extracted DNA. The number of bacterial rRNA16S copies was higher in the *Anabaena* bloom with a maximum of  $2.7 \times 10^5$  copies ng<sup>-1</sup> extracted DNA in the free-living (ABF) (Figure III 2). In contrast, cyanobacterial rRNA16S copies were more abundant in the *Microcystis* bloom with a maximum of  $8.5 \times 10^4$  copies ng<sup>-1</sup> extracted DNA in associated fraction of *Microcystis* bloom (MBA). The differences between the *Anabaena* fractions and *Microcystis* fractions may be a reflection of the difference in the colonies shapes: large colonies for *Microcystis* and aggregate of filaments of

*Anabaena*. Interestingly, the number of cyanobacterial rRNA 16S copies was 2 fold higher in the associated fractions than their respective free-living fractions for both blooms.

In our study, the number of archaeal rRNA 16S copies was low (maximum of  $1 \times 10^4$  copies  $\text{ng}^{-1}$  extracted DNA) in both fractions during both blooms with no significant differences (Figure III. 2.). Other authors have reported that the planktonic freshwater habitats is one of the largest reservoirs of archaeal diversity (Auguet et al. 2010, Lirós et al. 2010) and that the archaea are widespread in freshwater ecosystem (DeLong 1998). This is in contrast to the results of Dziallas & Grossart (2011, 2012) who found archaeal rRNA 16S in xenic culture of *Microcystis* but not in environmental samples. This seems to point towards a negative interaction between cyanobacteria and archaea. Indeed, to our knowledge, there are no other reports concerning the abundance of archaea in phycosphere. We therefore propose that the low values we observed may reflect the complex interactions between cyanobacteria and archaea with a potentially negative selection against the archaeal cells by the cyanobacterial bloom.



**Figure III. 2.: Copy numbers of the *nifH*, *amoA* AOB, *nirS*, *nirK* and Bacterial, Cyanobacterial and Archaeal rRNA 16 genes in the attached (A) and free-living (F) fractions of *Anabaena* (AB) and *Microcystis* (MB) blooms (n=3; error bars represent standard deviations). Different letters indicates significant differences.**

### **Ammonia-oxidizing abundance in *Anabaena* and *Microcystis* phycosphere**

To evaluate nitrogen-transforming microorganisms within phycospheres we investigated both AOA (for ammonia-oxidizing archaea) and AOB (for ammonia-oxidizing bacteria) in the associated and free-living fraction of *Microcystis* and *Anabaena* bloom. As nitrogen-fixing cyanobacteria are a rich source of nitrogen compounds (Ploug et al. 2010, 2011), we hypothesized that the ammonia-oxidizing microorganisms would show different patterns between non-N<sub>2</sub> fixing *Microcystis* and the N<sub>2</sub> fixing *Anabaena* phycospheres. However, the quantification of the ammonia-oxidizing functional genes shows no significant differences between the investigated blooms (Figure III. 2.).

We detected no genes encoding subunits of a potential ammonia monooxygenase (AMO) in the associated fraction of *Anabaena* and *Microcystis* bloom. This lack of detection may be due to the difficulty in obtaining an efficient amplification of functional gene in cyanobacterial bloom samples as suggested by Tuomainen et al. (2003). However, considering the results of Choi et al. (2010) who observed that the presence of algae and cyanobacteria in wastewater treatment systems inhibiting the growth of nitrifying bacteria, an ecological rather technical explanation may be the reason. Indeed, the no detection of nitrifying bacteria in our associated samples may therefore be explained by the potential competitive exclusion between cyanobacteria and nitrifying microorganisms as they both use ammonia.

Bacterial *amoA* was detectable in the free-living fractions with a maximum of  $1 \times 10^2$  copies ng<sup>-1</sup> extracted DNA with no significant differences between blooms. This is similar to what has been observed in the Baltic sea, where with no bacterial *amoA* gene fragments were found in *Nodularia* sp. aggregate samples, although they were detected in the surrounding non-aggregated cyanobacterial bloom (Tuomainen et al. 2003).

No archaeal *amoA* gene was amplified for both blooms and both fractions. This is not surprising given the abundance of archaea found in our samples. However, in *Microcystis* culture Dziallas & Grossart (2012) reported that the archaeal *amoA* was detectable by PCR. In natural freshwater ecosystems, the contribution of ammonia oxidizing bacteria and archaea to the nitrogen cycle is not well characterized. In these ecosystems, pH and nutrient availability seem to be important as controlling factors in promoting AOA or AOB (Auguet & Casamayor

2013). In fact, it has also been observed that in oligotrophic waters AOA may easily outcompete AOB and heterotrophs under ammonia limitation (Martens-Habben et al. 2009). It has been also reported that AOB were absent in oligotrophic high-altitude lake (Auguet et al. 2012, Hayden & Beman 2014) but were predominant in nutrient-rich waters (Hugoni et al. 2013). It may well be that the eutrophic state of the investigated lake in our study could explain the absence of AOA and the presence of AOB in the free-living fractions.

### **Denitrifying bacteria abundance in *Anabaena* and *Microcystis* phycosphere**

In lacustrine environments, denitrification is generally occurs in sediments and little denitrifying activity is observed in the water column (Seitzinger 1988). However, the denitrification may become important in active nutrient recycling zones (Bianchi et al. 1994). In marine ecosystem it has been shown that the center of filamentous cyanobacterial colonies can become anoxic (Klawonn et al. 2015) allowing the growth of active denitrifying bacteria (Wyman et al. 2013). We therefore explored abundance of the functional microbial groups involved in denitrification in the phycosphere of *Anabaena* and *Microcystis*.

The *nirK* and *nirS*, coding for nitrite reductases (Zumft 1997), were found in both the free living and associated fractions but were significantly more abundant in the free-living fractions of both blooms (Figure III. 2.). No significant differences were observed in the abundance of both *nirK* and *nirS* when comparing the free-living fraction of *Microcystis* to the free-living fraction of *Anabaena* bloom. Tuomainen et al. (2003) reported that both types of nitrite reductase fragments could be amplified from suspensions of non-aggregated filament samples, whereas only the *nirS* type was found in aggregates of *Nodularia* sp.. In our study, the *nirK* gene copy numbers dominated over *nirS* gene (Fisher test;  $p$ -value > 0,001) by a factor of 2 in all samples except for the associated fraction of *Anabaena* where the abundance of the two genes did not significantly differ (Fisher test;  $p$ -value = 0,4).

Several studies from a variety of environments have shown that denitrifying bacteria possessing *nirS* gene have a preference for constant low O<sub>2</sub> concentrations (e.g. Castro-González et al. 2005). Therefore, differences in abundance and in maintaining the two types of nitrite reductases may partly come from an ecological niche differentiation based on O<sub>2</sub> concentrations within the free-living and the associated fractions of both bloom. Although other studies of bloom of nitrogen fixing cyanobacteria in the Baltic sea showed negligible denitrification activity (Hietanen et

al. 2002, Tuomainen et al. 2003), finding both the *nirS* and the *nirK* genes is an indicator of the genetic potential of denitrification in *Anabaena* and *Microcystis* freshwater blooms.

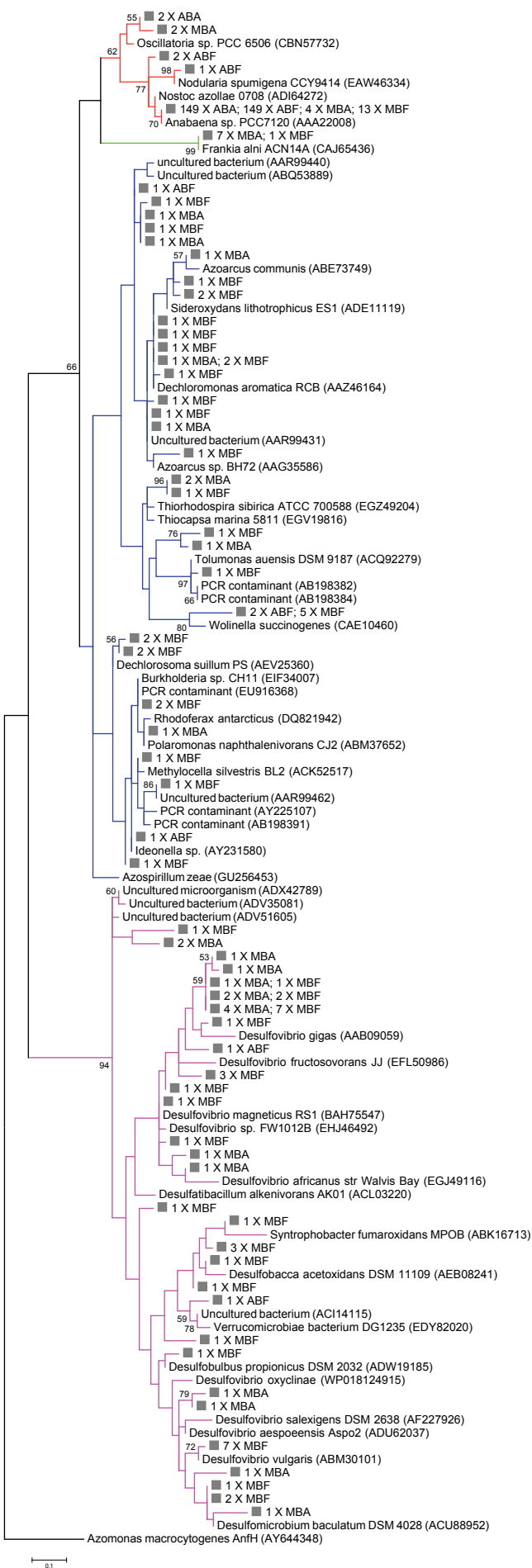
### **Abundance and phylogenetic characterization of *nifH*-containing community *Anabaena* and *Microcystis* phycosphere**

Clear differences in the number *nifH* copies were observed between the *Anabaena* and the *Microcystis* blooms although no significant differences were observed between free-living and associated fractions in terms of number of copies ng<sup>-1</sup> extracted DNA for each bloom. To the best to our knowledge only Woodhouse et al. (2013) and Davis et al. (2015) have investigated *nifH* gene diversity associated with freshwater cyanobacterial blooms, namely the non-heterocyst *Lyngbya robusta* and *Planktothrix aghardhii* respectively. Therefore, little is known about the diazotrophic diversity of freshwater cyanobacterial blooms. In our study we investigated the *nifH* diversity associated with *Anabaena* and *Microcystis* sp. phycosphere.

A total of 432 sequences were obtained after quality check. Clustering the sequencing at 98% similarity yielded 69 OTUs. Rarefaction curve generated using only the non-*Anabaena nifH* sequences (Figure III. S1.) suggested that a deeper sequencing effort is still needed for *Anabaena* and *Microcystis* blooms.

Contaminant sequences were not expected to occur and since we did not have bands in the negative PCR samples we selected known PCR contaminants from databases (Zehr, et al. 2003b, Goto et al. 2005). However, possibly as a consequence of the low depth of our sequencing and relatively small number of samples, we did not find sequences that robustly matched with contaminating sequences (Figure III. 3.).

Even though some OTUs clustered together with robust bootstrap but did not share close similitude with the sequences present in the database, most of OTUs we recovered were close to those of known diazotrophs (Figure III. 3.). The non-cyanobacterial diazotrophs of the *Microcystis* bloom are affiliated with *nifH* cluster 1K (predominantly comprised of  $\beta$  and  $\alpha$ -proteobacteria), 1F ( $\epsilon$ -proteobacteria), 1D (Actinobacteria) and 3 (sulfate reducing genera of  $\delta$ -proteobacteria) (Figure III 3.).



**Figure III. 3.: Maximum likelihood phylogenetic tree of amino acid *nifH* OTUs sequences recovered from this study (indicated by grey square) including the sample origin (the attached (A) and free-living (F) fractions of *Anabaena* (AB) and *Microcystis* (MB) blooms) with the number of sequences for each OTU and amino acid sequences of previously isolated accession numbers. Bootstrap over 50% for 1000 permutations are shown. Canonical *nifH* clusters are indicated with different colors: Cluster 1B in red, Cluster 1D in green, Cluster 1K/J and F in blue and cluster 3 in pink.**



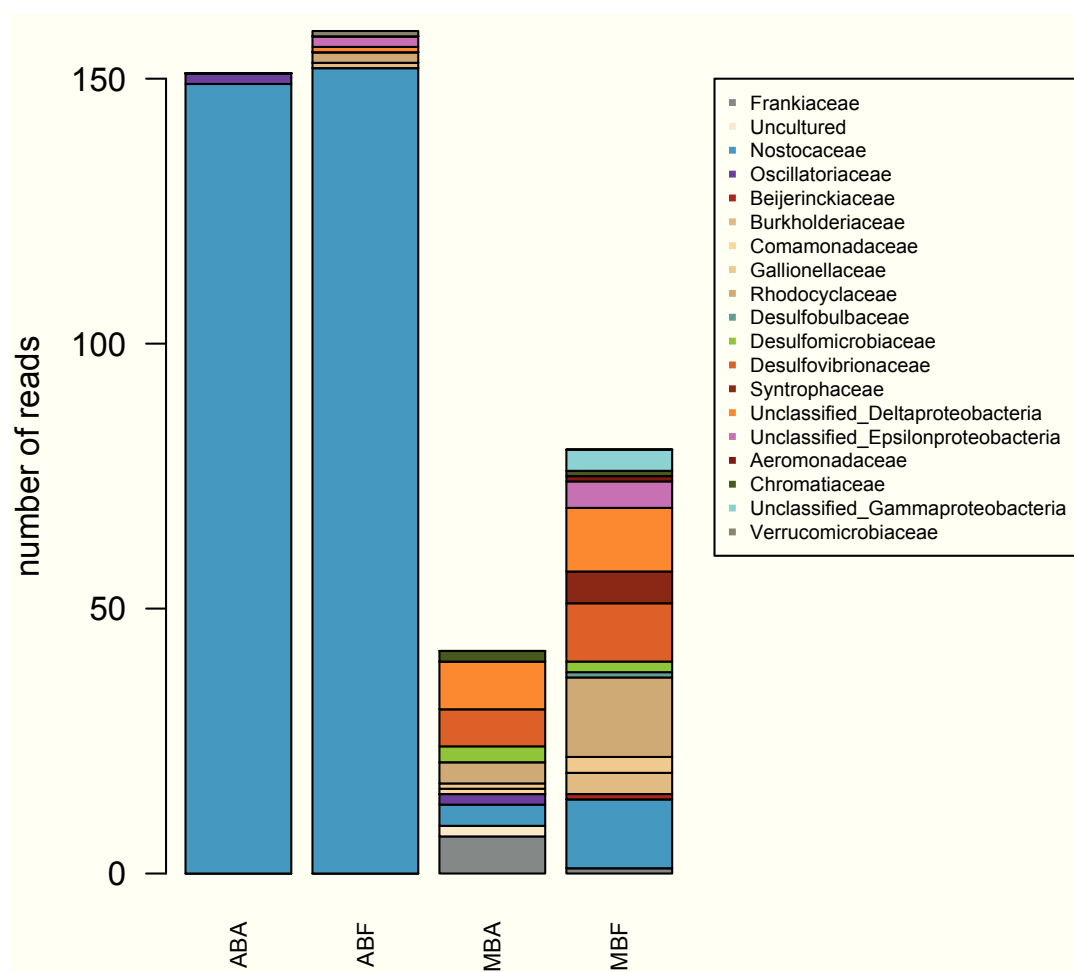
The most abundant OTUs (accounted for 73% of all sequences) were exclusively affiliated with *Anabaena nifH*. Not surprisingly, this OTU is mostly dominates during the *Anabaena* bloom with 99% of sequences for the associated fraction and 94% of sequences for the free-living fraction (Figure III. 4.). For the *Microcystis* bloom a lower number of *Anabaena nifH* sequences were detected during this bloom (9.5% and 16.2% for the associated and free-living fractions respectively). In our study, only a few sequences were found affiliated to cyanobacterial *nifH* other than *Anabaena* (Figure III. 4.). Conversely, during the *Microcystis* bloom we observed an overwhelming dominance of Proteobacteria (64.2% and 82.5% for the associated and the free-living fractions respectively). This is coherent with studies from marine ecosystems which showed that Proteobacteria were most common and accounted for a substantial part of the *nifH* gene pool in marine surface waters and that these genes are at least occasionally expressed (Farnelid et al. 2011). In freshwater ecosystems, Zani et al. (2000) detected *nifH* transcripts and they demonstrated that Cyanobacteria and  $\alpha$ -Proteobacteria were actively transcribing the nitrogen fixation marker gene *nifH* in Lake George (New York). Also, in the study of Davis et al. (2015) the *Planktothrix* bloom occurs with other *nifH*-containing cyanobacteria and a majority of Proteobacteria.

In our study, the  $\beta$ -proteobacteria were present in both blooms (3.7% in the free-living fraction of *Anabaena* and 14.3% and 27.5% in the associated and free-living fraction of *Microcystis* respectively) with a dominance of sequences affiliated to the *Rhodocyclales* (1.6% in the free-living fraction of *Anabaena* and 9.5% and 18.7% for the associated and free-living fraction of *Microcystis*; (Figure III. 4.)) mostly as *Dechloromonas aromatica*. Farnelid et al. (2011) found that sequences clustering with *Dechloromonas aromatica* were widespread in marine waters and potentially active  $N_2$ -fixers. Here we report that they may also occur in freshwater ecosystems during *Microcystis* blooms.

In the cluster 3, which comprises sequences from many known anaerobic bacteria, we found 29 OTUs belonging to the  $\delta$ -proteobacteria of which 28 were found in the *Microcystis* bloom. It was reported that in the hypersaline Mono Lake (California) the majority of clones (57%) grouped in Cluster 3 and were retrieved at every depth indicating little vertical zonation related to the prominent gradients in oxygen and ammonia (Steward et al. 2004) however nitrogen fixation rate measurements were below detection. In our study, these bacteria may survive in

oxygenated waters by inhabiting anoxic microzones offered by *Microcystis* scum, like has been observed in mucilaginous aggregate of non-heterocystous *Oscillatoria* sp. in marine waters where reduced O<sub>2</sub> and N<sub>2</sub>-fixation occur (Paerl & Prufert 1987).

Most of the  $\delta$ -proteobacteria belongs to the *Desulfovibrionales* (23.8% and 16.2% of total sequences of the associated and the free-living fractions respectively) and were distantly related to anaerobes mostly as *Desulfovibrio* (4.7% and 13.7% of total sequences of the associated and the free-living fractions respectively). The *Desulfovibrio* were also reported in freshwater bloom of *Lyngbya* (Woodhouse et al. 2013).



**Figure III. 4.: Abundance and diversity of *nifH* gene at the family level in the attached (A) and free-living (F) fractions of *Anabaena* (AB) and *Microcystis* (MB) blooms.**

An important number of sequences are related to unclassified  $\delta$ -proteobacteria during the *Microcystis* bloom (21.4% and 15% of total sequences in the associated and the free-living fractions respectively) revealing an unknown diversity of this *nifH*-containing group (Figure III. 4.).

Interestingly, we found two important OTU namely an unclassified  $\epsilon$ -proteobacteria OTU close to *Wolinella succinogenes* observed only in the free-living fractions of both *Anabaena* and *Microcystis* blooms and an OTU close to *Frankia Alni* found only in the *Microcystis* bloom and mostly in the associated fraction (16.7%, Figure III. 4.). Since *nif* gene of *Wolinella* (Baar et al. 2003) and of *Frankia* (Sellstedt & Richau 2013) are related to soil- and plant-associated bacteria, this may reflect either an exogenous supply of *nifH*-containing bacteria from the surrounding soil. Indeed, it is possible that the genes are relics maintained by the introduction of microorganisms from other environments where nitrogen fixation is favourable. This also can be explained by the fact that nitrogenase has an alternate function in such environments. Indeed, nitrogenase can reduce a variety of substrates besides  $N_2$  including acetylene, hydrogen cyanide, carbonyl sulphide, carbon disulfide, carbon dioxide and thiocyanates (Rasche & Seefeldt 1997).

Overall, our work revealed different patterns of functional groups involved in the transformation of nitrogen in the associated and free-living fractions of both  $N_2$  fixing and non- $N_2$  fixing blooms in freshwaters. Nitrogen fixation and denitrifying process may occur within the associated communities of both  $N_2$  fixing and non- $N_2$  fixing bloom indicating that these microbial communities are much more dynamic than previously thought. However, these communities are more abundant in the free-living fractions suggesting that cyanobacterial blooms can be seen as a source of nitrogen sources to the free-living bacterial communities regardless of the functional traits of the cyanobacterial bloom. We also highlighted the high diversity of *nifH*-containing bacteria during non- $N_2$  fixing cyanobacteria blooms, which could play key role in supporting non- $N_2$  fixing cyanobacterial bloom.

## **Material and Methods**

### **Study sites, sampling and fraction separation**

Samples were collected from a recreational lake located near the city of Champs-sur-Marne (Seine-et-Marne, Île-de-France, France, 48°51'47.0 N, 02°35'53.9 E). The lake has a surface area of 10.3 ha and an average depth of 2.70 m, and since 2005, has had several episodes of cyanobacterial blooms.

In 2012, two distinct cyanobacterial genera bloomed during summer: *Anabaena* sp. in July and *Microcystis* sp. in September. During both blooms, water

was collected three times daily during three consecutive days. Samples were filtered differentially to separate the free-living bacteria (ABF for *Anabaena* bloom and MBF for *Microcystis* bloom) from cyanobacterial-associated bacteria (ABA for *Anabaena* bloom and MBA for *Microcystis* bloom) fractions.

For *Anabaena* sp., water samples were first filtered through a 20 µm phytoplankton net and then 50 ml of filtrate were filtered through a 1.2 µm polycarbonate filter (Isopore Membrane Millipore) to concentrate ABA. Then, the filtrate was passed through a 0.2 µm polycarbonate filter (Nuclepore Polycarbonate Whatman) in order to concentrate the ABF. For *Microcystis* sp., water samples were also filtered through a 20 µm phytoplankton net, and due to the large size of *Microcystis* colonies the concentrated samples were directly stored in cryotubes for the MBA. The remaining filtrate was then passed through a 0.2 µm polycarbonate filter (Nuclepore Polycarbonate Whatman) to concentrate the MBF. Samples were directly frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C until DNA extraction.

### **DNA extraction**

DNA was extracted following the procedure of (Massana et al. 1997) with some modifications. Briefly, each filter was flash-frozen in liquid nitrogen, and then transferred in Lysing Matrix E (MP Biomedicals, Illkirch, France) with 1.1 ml of lysis buffer (40mM EDTA, 50mM Tris-HCl, 0.75 M sucrose). Bead-beating was applied for 3x30 sec at a speed of 6.5 m.s<sup>-1</sup> (FastPrep®-24, MP Biomedicals, France). Then, Lysozyme (0.6mg. ml<sup>-1</sup>) was added to the filters and incubated at 37°C for 45 min with gentle stirring. Subsequently, sodium dodecyl sulfate (1% final concentration) and proteinase K (Thermo Scientific, France) were added, and incubated at 55°C for at least 90 min. Filter-debris were pelletized by centrifugation at 14 000 g for 5 min and supernatants were collected and purified twice by phenol-chloroform-isoamyl alcohol. After precipitation with sodium acetate (0.1 vol) and cold isopropanol (0.6 vol), the nucleic acids were washed with 70% ethanol, and then re-suspended in 100µL milliQ water. The DNA was stored at -20°C until analyses.

### **Quantitative Real-time PCR assay**

Quantitative real-time PCR (qPCR) was carried out on a CFX96 Real-time System (C1000<sup>TM</sup> Thermal cycler, Bio-Rad, California, USA) using SYBR green as the fluorescent dye. The respective 20 µl volume of reaction mixtures contained 1X of SYBR green PCR Master Mix (SsoAdvanced<sup>TM</sup> universal SYBR® Green Supermix, Bio-Rad, California, USA), 0.5 µM of each primer set and 2.5 ng of BSA.

Dilution series of each different DNA extraction sample were tested in a preexperiment to avoid inhibition of PCR. The appropriate DNA extracts dilutions for each sample was used in three experimental replicates. Serial linearized plasmid dilutions of respective 16S and functional genes ranging from  $10^2$  to  $10^8$  gene copies  $\mu\text{l}^{-1}$  were used as standards as described in Bru et al. (2011).

All PCR runs started with an initial enzyme activation step performed at  $95^\circ\text{C}$  for 3 min and followed by the melting curve, consisting of an increase of  $0.5^\circ\text{C}$  from  $65^\circ\text{C}$  to  $95^\circ\text{C}$ . The subsequent thermal profiles were different for each gene, as described in Bru et al. (2011). The specificity of amplification was checked by the observation of a single melting peak and the presence of a unique band of the expected size in a 1% agarose gel stained with ethidium bromide. The PCR efficiencies were calculated from the standard curve by the formula  $\text{Eff} = [10^{(-1/\text{slope})} - 1] \times 100\%$  and accounted for  $> 90\%$  for all reactions.

The results were expressed as gene copy number per ng of extracted DNA rather than per filtered water volume to minimize the possible bias related to the DNA extraction yield or the to different sampling strategies between blooms. All statistical analyses were performed using the statistical software package R 2.15.1 (R Development Core Team, Vienna, Austria). Only differences significant at  $p < 0.05$  were considered. Data of gene abundances were log-transformed to provide variance homogeneity before the statistical analyses. One-way analysis of variance (ANOVA), followed by a post hoc Tukey honestly significant difference test using “multcomp” package (Bretz et al. 2002) under R, was performed to access the significant differences of the abundances of each target gene between samples. Fisher’s exact tests were performed to access the significant differences of different gene between samples.

### **Cloning, sequencing and phylogenetic analysis of *nifH* gene**

The *nifH* genes for each sample were amplified using the same condition of the *nifH* qPCR. Results were checked for the correct product size ( $\sim 360$  bp) on gel and none of the negative control resulted in visible band. Amplicons were purified by phenol-chloroform-isoamyl alcohol and then quantified using Qubit dsDNA HS Assay Kits (Invitrogen, France) following the manufacturer’s protocol. The CloneJet PCR Cloning Kit (Thermo Scientific, France) was used to ligate the purified amplicons following the manufacturer’s protocol and then transformed in *Escherichia coli* DH5 $\alpha$  competent cells. A colony PCR was used to directly screen the positive clones. The

clones containing an insert of the correct size were selected. For the *Anabaena* bloom 360 clones were obtained with 180 clones for each ABA and ABF. For the *Microcystis* bloom, it was more difficult to obtain positives clones, probably due to less abundance of the target gene as shown in the qPCR results. Nevertheless, 216 clones were obtained, 60 and 156 clones for MBA and MBF respectively. Each library was sequenced by GATC (Konstanz, Germany) with the pJET1.2 forward primer.

Sequences without F primer and shorter than the threshold of 360 pb in length were eliminated. Chimeras were checked using USEARCH CHIMERA CHECK in the FunGene Pipeline (Fish et al. 2013). Then, 430 sequences were retained for further analysis with 151 and 159 sequences for ABA and ABF respectively and 42 and 80 sequences for MBA and MBF respectively.

The sequences were aligned using GeneDoc (Nicholas et al. 1997), evaluated by eye and subjected to minor manual corrections. The nucleotide sequences were clustered into *nifH* operational taxonomic unit (OTU) at 98% nucleotide similarity. Taxonomy of representative sequences of *nifH* OTUs obtained was inferred using FRAMEBOT under the FunGene Pipeline, to compare translated *nifH* sequences to the *nifH* seed sequences of the functional gene pipeline and repository database. The closest cultivated representatives were identified using BLAST resources and added to the alignments. In addition, sequences of uncultured nitrogen-fixing bacteria were also added to the alignment.

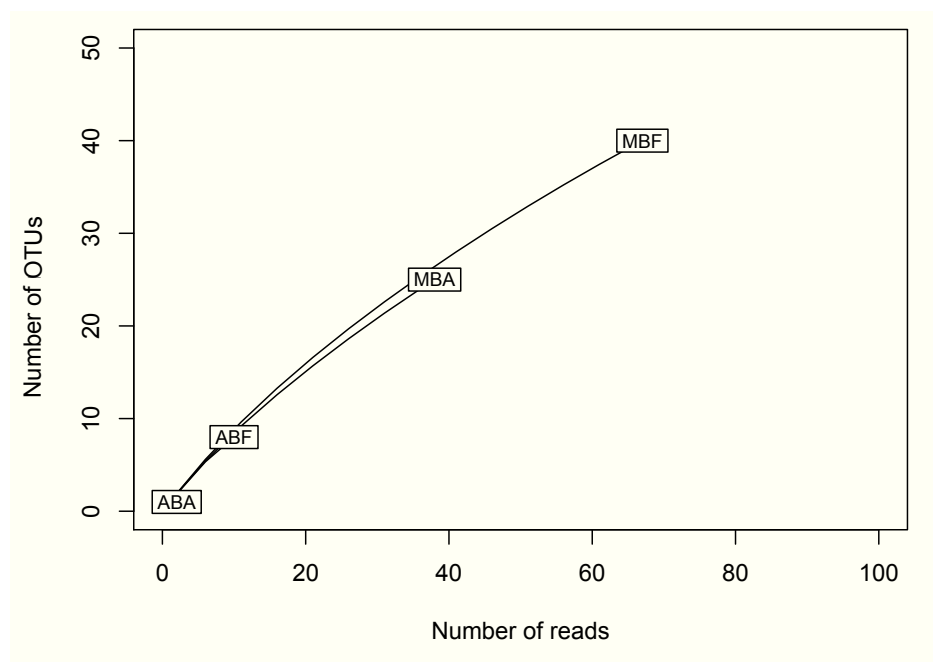
*nifH*-like sequences related to  $\alpha$  and  $\beta$ -proteobacteria may occur in PCR reagents (Zehr, Crumbliss, et al. 2003). Although none of our negative controls produced visible product, to reduce the risk of misinterpreting reagent contamination as true environmental OTU, sequences from putative contaminant *nifH* from previous reports (Zehr, Crumbliss, et al. 2003, Goto et al. 2005) were selected from the ARB *nifH* database (<http://www.es.ucsc.edu/~wwwzehr/research/database/>) and integrated to the data obtained and those with  $\geq 96\%$  amino acid identity were maintained. Finally, a maximum-likelihood phylogenetic tree of the aligned *nifH* translated nucleotide was constructed in MEGA5.2.2 (Tamura et al. 2011).

## Acknowledgements

We would like to thank Emma Rochelle-Newall for linguistic improvement. This study was funded by the PHYCOCYANO project in the Jeunes Chercheurs-Jeunes

Chercheuses program of the French ANR (Agence Nationale de la Recherche; ANR-11- JSV7-014-01).

## Supporting Information



**Figure III. S 1.: Rarefaction analysis for the *nifH* sequence data.** The curves were generated with non-*Anabaena nifH* operational taxonomic unit (98% identity, unique reads are considered as different OTU) for the attached (A) and free-living (F) fractions for *Anabaena* (AB) and *Microcystis* (MB) blooms.





## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Auguste JC, Barberan A, Casamayor EO** (2010) Global ecological patterns in uncultured Archaea. *ISME J* **4**:182–190
- Auguste JC, Casamayor EO** (2013) Partitioning of Thaumarchaeota populations along environmental gradients in high mountain lakes. *FEMS Microbiol Ecol* **84**:154–164
- Auguste JC, Nomokonova N, Camarero L, Casamayor EO** (2011) Seasonal changes of freshwater ammonia-oxidizing archaeal assemblages and nitrogen species in oligotrophic alpine lakes. *Appl Environ Microbiol* **77**:1937–45
- Auguste JC, Triadó-Margarit X, Nomokonova N, Camarero L, Casamayor EO** (2012) Vertical segregation and phylogenetic characterization of ammonia-oxidizing Archaea in a deep oligotrophic lake. *ISME J* **6**:1786–97
- Baar C, Eppinger M, Raddatz G, Simon J, Lanz C, Klimmek O, Nandakumar R, Gross R, Rosinus A, Keller H, Jagtap P, Linke B, Meyer F, Lederer H, Schuster SC** (2003) Complete genome sequence and analysis of *Wolinella succinogenes*. *Proc Natl Acad Sci USA* **100**:11690–11695
- Bell W, Mitchell R** (1972) Chemotactic and growth responses of marine bacteria to algal extracellular products. *Biol Bull* **143**:265–277
- Bianchi M, Bonin P, Feliatra** (1994) Bacterial nitrification and denitrification rates in the Rhone River plume (northwestern Mediterranean Sea). *Mar Ecol Prog Ser* **103**:197–202
- Braker G, Zhou J, Wu L, Devol AH, Tiedje JM** (2000) Nitrite reductase genes (*nirK* and *nirS*) as functional markers to investigate diversity of denitrifying bacteria in pacific northwest marine sediment communities. *Appl Environ Microbiol* **66**:2096–2104
- Bretz F, Hothorn T, Westfall P** (2002) On Multiple Comparisons in R. *R News* **2**:14–19
- Bru D, Ramette A, Saby NP a, Dequiedt S, Ranjard L, Jolivet C, Arrouays D, Philippot L** (2011) Determinants of the distribution of nitrogen-cycling microbial communities at the landscape scale. *ISME J* **5**:532–42
- Capone DG** (2001) Marine nitrogen fixation: What's the fuss? *Curr Opin Microbiol* **4**:341–348
- Capone DG, Ferrier MD, Carpenter EJ** (1994) Amino acid cycling in colonies of the planktonic marine cyanobacterium *Trichodesmium thiebautii*. *Appl Environ Microbiol* **60**:3989–3995
- Castro-González M, Braker G, Fariás L, Ulloa O** (2005) Communities of *nirS*-type denitrifiers in the water column of the oxygen minimum zone in the eastern South Pacific. *Environ Microbiol* **7**:1298–1306
- Cébron A, Coci M, Garnier J, Laanbroek HJ** (2004) Denaturing Gradient Gel Electrophoretic Analysis of Ammonia-Oxidizing Bacterial Community Structure in the Lower Seine River: Impact of Paris Wastewater Effluents. *Appl Environ Microbiol* **70**:6726–6737
- Choi O, Das A, Yu CP, Hu Z** (2010) Nitrifying bacterial growth inhibition in the presence of algae and cyanobacteria. *Biotechnol Bioeng* **107**:1004–1011

- Davis TW, Bullerjahn GS, Tuttle T, McKay RM, Watson SB** (2015) Effects of increasing nitrogen and phosphorus concentrations on phytoplankton community growth and toxicity during *Planktothrix* blooms in Sandusky Bay, Lake Erie. *Environ Sci Technol* **49**:7197–7207
- Delong EF** (1998) Everything in moderation: Archaea as “non-extremophiles.” *Genome Evol* **8**:649–54
- Dolman AM, Rücker J, Pick FR, Fastner J, Rohrlack T, Mischke U, Wiedner C** (2012) Cyanobacteria and cyanotoxins: the influence of nitrogen versus phosphorus. *PLoS One* **7**:e38757
- Dziallas C, Grossart HP** (2011) Temperature and biotic factors influence bacterial communities associated with the cyanobacterium *Microcystis sp.* *Environ Microbiol* **13**:1632–1641
- Dziallas C, Grossart HP** (2012) Microbial interactions with the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* and their dependence on temperature. *Mar Biol* **159**:2389–2398
- Edgar RC, Haas BJ, Clemente JC, Quince C, Knight R** (2011) UCHIME improves sensitivity and speed of chimera detection. *Bioinformatics* **27**:2194–2200
- Falcón LI, Carpenter EJ, Cipriano F, Bergman B, Capone DG** (2004) N<sub>2</sub> Fixation by Unicellular Bacterioplankton from the Atlantic and Pacific Oceans: Phylogeny and In Situ Rates N<sub>2</sub> Fixation by Unicellular Bacterioplankton from the Atlantic and Pacific Oceans. *Appl Environ Microbiol* **70**:765–770
- Falkowski PG** (1997) Evolution of the nitrogen cycle and its influence on the biological sequestration of CO<sub>2</sub> in the ocean. *Nature* **387**:272–275
- Farnelid H, Andersson AF, Bertilsson S, Al-Soud WA, Hansen LH, Sørensen S, Steward GF, Hagström Å, Riemann L** (2011) Nitrogenase gene amplicons from global marine surface waters are dominated by genes of non-cyanobacteria. *PLoS One* **6**:e19223.
- Ferber LR, Levine SN, Lini A, Livingston GP** (2004) Do cyanobacteria dominate in eutrophic lakes because they fix atmospheric nitrogen? *Freshw Biol* **49**:690–708
- Fish JA, Chai B, Wang Q, Sun Y, Brown CT, Tiedje JM, Cole JR** (2013) FunGene: The functional gene pipeline and repository. *Front Microbiol* **4**:1–14
- Francis CA, Beman JM, Kuypers MMM** (2007) New processes and players in the nitrogen cycle: the microbial ecology of anaerobic and archaeal ammonia oxidation. *ISME J* **1**:19–27
- Glibert PM, Bronk DA** (1994) Release of dissolved organic nitrogen by marine diazotrophic cyanobacteria, *Trichodesmium spp.* *Appl Environ Microbiol* **60**:3996–4000
- Goto M, Ando S, Hachisuka Y, Yoneyama T** (2005) Contamination of diverse *nifH* and *nifH*-like DNA into commercial PCR primers. *FEMS Microbiol Lett* **246**:33–38
- Hall BG** (2013) Building phylogenetic trees from molecular data with MEGA. *Mol Biol Evol* **30**:1229–1235
- Hallin S, Lindgren PE** (1999) PCR detection of genes encoding nitrite reductase in denitrifying bacteria. *Appl Environ Microbiol* **65**:1652–7
- Hayden CJ, Beman JM** (2014) High Abundances of Potentially Active Ammonia-Oxidizing Bacteria and Archaea in Oligotrophic, High-Altitude Lakes of the Sierra Nevada, California, USA. *PLoS One* **9**:e111560

- Head IM, Hiorns WD, Embley TM, McCarthy a J, Saunders JR** (1993) The phylogeny of autotrophic ammonia-oxidizing bacteria as determined by analysis of 16S ribosomal RNA gene sequences. *J Gen Microbiol* **139**:1147–1153
- Hietanen S, Moisander P, Kuparinen J, Tuominen L** (2002) No sign of denitrification in a Baltic Sea cyanobacterial bloom. *Mar Ecol Prog Ser* **242**:73–82
- Hugoni M, Domaizon I, Taib N, Biderre-Petit C, Agogu   H, Galand PE, Debroas D, Mary I** (2015) Temporal dynamics of active Archaea in oxygen-depleted zones of two deep lakes. *Environ Microbiol Rep* **7**:321–329.
- Hugoni M, Etien S, Bourges A, Lep  re C, Domaizon I, Mallet C, Bronner G, Debroas D, Mary I** (2013) Dynamics of ammonia-oxidizing Archaea and Bacteria in contrasted freshwater ecosystems. *Res Microbiol* **164**:360–370
- Klawonn I, Bonaglia S, Br  uchert V, Ploug H** (2015) Aerobic and anaerobic nitrogen transformation processes in N<sub>2</sub>-fixing cyanobacterial aggregates. *ISME J* **9**:1456-1466
- Kolzau S, Wiedner C, Rücker J, K  hler J, K  hler A, Dolman AM** (2014) Seasonal patterns of Nitrogen and Phosphorus limitation in four German Lakes and the predictability of limitation status from ambient nutrient concentrations. *PLoS One* **9**:e96065
- K  nneke M, Bernhard AE, de la Torre JR, Walker CB, Waterbury JB, Stahl DA** (2005) Isolation of an autotrophic ammonia-oxidizing marine archaeon. *Nature* **437**:543–546
- Llir  s M, Gich F, Plasencia A, Auguet JC, Darchambeau F, Casamayor EO, Descy JP, Borrego C** (2010) Vertical distribution of ammonia-oxidizing crenarchaeota and methanogens in the epipelagic waters of lake kivu (rwanda-democratic republi of the congo). *Appl Environ Microbiol* **76**:6853–6863
- MacGregor BJ, Mooy B Van, Baker BJ, Mellon M, Moisander PH, Paerl HW, Zehr J, Hollander D, Stahl DA** (2001) Microbiological, molecular biological and stable isotopic evidence for nitrogen fixation in the open waters of Lake Michigan. *Environ Microbiol* **3**:205–219
- Martens-Habbena W, Berube PM, Urakawa H, la Torre JR de, Stahl DA** (2009) Ammonia oxidation kinetics determine niche separation of nitrifying Archaea and Bacteria. *Nature* **461**:976–979
- Massana R, Murray AE, Preston CM, DeLong EF** (1997) Vertical distribution and phylogenetic characterization of marine planktonic Archaea in the Santa Barbara Channel. *Appl Environ Microbiol* **63**:50–6
- Moisander PH, Beinart RA, Voss M, Zehr JP** (2008) Diversity and abundance of diazotrophic microorganisms in the South China Sea during intermonsoon. *ISME J* **2**:954–67
- Moisander PH, Serros T, Paerl RW, Beinart RA, Zehr JP** (2014) Gammaproteobacterial diazotrophs and nifH gene expression in surface waters of the South Pacific Ocean. *ISME J* **8**:1–12
- Mulholland MR, Bronk D, Capone DG** (2004) Dinitrogen fixation and release of ammonium and dissolved organic nitrogen by *Trichodesmium* IMS101. *Aquat Microb Ecol* **37**:85–94
- Mulholland MR, Capone DG** (2000) The nitrogen physiology of the marine N<sub>2</sub>-fixing cyanobacteria. *Trends Plant Sci* **5**:149–153
- Nicholas KB, Nicholas Jr. HB, W. Deefield II D** (1997) GeneDoc Analysis and Visualization of Genetic Variation. *EMBnet.news* **4**:1–22

- Paerl HW** (1978) Role of heterotrophic bacteria in promoting N<sub>2</sub> fixation by *Anabaena* in aquatic habitats. *Microb Ecol* **4**:215–231
- Paerl HW, Otten TG** (2013) Harmful Cyanobacterial Blooms: Causes, Consequences, and Controls. *Microb Ecol* **65**:995–1010
- Paerl HW, Prufert LE** (1987) Oxygen-poor microzones as potential sites of microbial N<sub>2</sub> fixation in nitrogen-depleted aerobic marine waters. *Appl Environ Microbiol* **53**:1078–1087
- Parveen B, Ravet V, Djediat C, Mary I, Quiblier C, Debroas D, Humbert JF** (2013) Bacterial communities associated with *Microcystis* colonies differ from free-living communities living in the same ecosystem. *Environ Microbiol Rep* **5**:716–724
- Paterson MJ, Schindler DW, Hecky RE, Findlay DL, Rondeau KJ** (2011) Comment: Lake 227 shows clearly that controlling inputs of nitrogen will not reduce or prevent eutrophication of lakes. *Limnol Oceanogr* **56**:1545–1547
- Pester M, Rattei T, Flechl S, Gröngroft A, Richter A, Overmann J, Reinhold-Hurek B, Loy A, Wagner M** (2012) *amoA*-based consensus phylogeny of ammonia-oxidizing archaea and deep sequencing of *amoA* genes from soils of four different geographic regions. *Environ Microbiol* **14**:525–39
- Philippot L** (2002) Denitrifying genes in bacterial and Archaeal genomes. *Biochim Biophys Acta* **1577**:355–376
- Philippot L, Hallin S, Schlöter M** (2007) Ecology of Denitrifying Prokaryotes in Agricultural Soil. *Adv Agron* **96**:249–305
- Ploug H, Adam B, Musat N, Kalvelage T, Lavik G, Wolf-Gladrow D, Kuypers MMM** (2011) Carbon, nitrogen and O<sub>2</sub> fluxes associated with the cyanobacterium *Nodularia spumigena* in the Baltic Sea. *ISME J* **5**:1549–58
- Ploug H, Kühl M, Buchholz-Cleven B, Jørgensen BB** (1997) Anoxic aggregates - An ephemeral phenomenon in the pelagic environment? *Aquat Microb Ecol* **13**:285–294
- Ploug H, Musat N, Adam B, Moraru CL, Lavik G, Vagner T, Bergman B, Kuypers MMM** (2010) Carbon and nitrogen fluxes associated with the cyanobacterium *Aphanizomenon sp.* in the Baltic Sea. *ISME J* **4**:1215–23
- Purkhold U, Pommerening-röser A, Schmid MC, Koops H, Juretschko S, Pommerening-ro A, Wagner M** (2000) Phylogeny of All Recognized Species of Ammonia Oxidizers Based on Comparative 16S rRNA and *amoA* Sequence Analysis: Implications for Molecular Diversity Surveys. *Appl Environ Microbiol* **66**:5368–5382
- Quinto C, de La Vega H, Flores M, Leemans J, Cevallos MA, Pardo MA, Azpiroz R, de Lourdes Girard M, Calva E, Palacios R** (1985) Nitrogenase reductase: A functional multigene family in *Rhizobium phaseoli*. *Proc Natl Acad Sci USA* **82**:1170–1174
- Rasche ME, Seefeldt LC** (1997) Reduction of Thiocyanate, Cyanate, and Carbon Disulfide by Nitrogenase: Kinetic Characterization and EPR Spectroscopic Analysis. *Biochemistry* **36**:8574–8585
- Schindler DW, Hecky RE, Findlay DL, Stainton MP, Parker BR, Paterson MJ, Beaty KG, Lyng M, Kasian SEM** (2008) Eutrophication of lakes cannot be controlled by reducing nitrogen input: results of a 37-year whole-ecosystem experiment. *Proc Natl Acad Sci USA* **105**:11254–11258

- Seitzinger SP** (1988) Denitrification in freshwater and coastal marine ecosystems: Ecological and geochemical significance. *Limnol Oceanogr* **33**:702–724
- Sellstedt A, Richau KH** (2013) Aspects of nitrogen-fixing actinobacteria, in particular free-living and symbiotic *frankia*. *FEMS Microbiol Lett* **342**:179–186
- Shen H, Niu Y, Xie P, Tao M, Yang X** (2011) Morphological and physiological changes in *Microcystis aeruginosa* as a result of interactions with heterotrophic bacteria. *Freshw Biol* **56**:1065–1080
- Sigee DC** (2005) Freshwater Microbiology : Biodiversity and Dynamic Interactions of Microorganisms in the Aquatic Environment. John Wiley & Sons, Ltd
- Smith CJ, Osborn a. M** (2009) Advantages and limitations of quantitative PCR (Q-PCR)-based approaches in microbial ecology. *FEMS Microbiol Ecol* **67**:6–20
- Steward GF, Zehr JP, Jellison R, Montoya JP, Hollibaugh JT** (2004) Vertical distribution of nitrogen-fixing phylotypes in a meromictic, hypersaline lake. *Microb Ecol* **47**:30–40
- Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S** (2011) MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol Biol Evol* **28**:2731–2739
- Tilman D, Kilham SS, Kilham P** (1982) Phytoplankton Community Ecology: The Role of Limiting Nutrients. *Annu Rev Ecol Syst* **13**:349–372
- Tuomainen JM, Hietanen S, Kuparinen J, Martikainen PJ, Servomaa K** (2003) Baltic Sea cyanobacterial bloom contains denitrification and nitrification genes, but has negligible denitrification activity. *FEMS Microbiol Ecol* **45**:83–96
- Tuomainen J, Hietanen S, Kuparinen J, Martikainen PJ, Servomaa K** (2006) Community structure of the bacteria associated with *Nodularia* sp. (Cyanobacteria) aggregates in the Baltic Sea. *Microb Ecol* **52**:513–22
- Vitousek P, Howarth R** (1991) Nitrogen limitation on land and in the sea: How can it occur? *Biogeochemistry* **13**:87–115
- Wang Q, Quensen JF, Fish JA, Lee TK, Sun Y, Tiedje JM, Cole JR** (2013) Ecological Patterns of *nifH* Genes in Four Terrestrial Climatic Zones Explored with Targeted Metagenomics Using FrameBot, a New Informatics Tool. *MBio* **4**:e00592–13
- Woodhouse JN, Ongley SE, Brown MV., Neilan BA** (2013) Microbial diversity and diazotrophy associated with the freshwater non-heterocyst forming cyanobacterium *Lyngbya robusta*. *J Appl Phycol* **25**:1039–1045
- Worm J, Søndergaard M** (1998) Dynamics of heterotrophic bacteria attached to *Microcystis* spp . (Cyanobacteria). *Aquat Microb Ecol* **14**:19–28
- Wyman M, Hodgson S, Bird C** (2013) Denitrifying *alphaproteobacteria* from the arabian sea that express *nosZ*, the gene encoding nitrous oxide reductase, in oxic and suboxic waters. *Appl Environ Microbiol* **79**:2670–2681
- Zani S, Mellon MT, Collier JL, Zehr JP** (2000) Expression of *nifH* genes in natural microbial assemblages in Lake George, New York, detected by reverse transcriptase PCR. *Appl Environ Microbiol* **66**:3119–3124
- Zehr JP** (2011) Nitrogen fixation by marine cyanobacteria. *Trends Microbiol* **19**:162–173

- Zehr JP, Crumbliss LL, Church MJ, Omoregie EO, Jenkins BD** (2003b) Nitrogenase genes in PCR and RT-PCR reagents: Implications for studies of diversity of functional genes. *Biotechniques* **35**:996–1005
- Zehr J, Jenkins B, Short S, Steward G** (2003a) Nitrogenase gene diversity and microbial community structure: a cross-system comparison. *Environ Microbiol* **5**:539–554
- Zehr JP, McReynolds LA** (1989) Use of degenerate oligonucleotides for amplification of the nifH gene from the marine cyanobacterium *Trichodesmium thiebautii*. *Appl Environ Microbiol* **55**:2522–6
- Zumft WG** (1997) Cell biology and molecular basis of denitrification. *Microbiol Mol Biol Rev* **61**:533–616







#### **IV. SYNTHESE GENERALE ET PERSPECTIVES**

---



Le postulat de départ de cette thèse était que les proliférations de cyanobactéries causent des modifications importantes dans les milieux où elles se produisent, que ce soit au niveau de leurs paramètres physico-chimiques ou biologiques, qui sont susceptibles de générer des changements drastiques dans les communautés bactériennes de ces milieux. Deux processus principaux étaient envisagés pour ces changements. Le premier était que de part les quantités importantes de matière organique générées lors des proliférations, des communautés bactériennes contenant des espèces ayant une grande affinité pour la matière organique étaient sélectionnées. En effet, les milieux aquatiques sont considérés, en comparaison des sols par exemple, comme des écosystèmes généralement assez pauvres en matière organique. Le second était qu'il pouvait exister des interactions spécifiques entre les diverses espèces de cyanobactéries impliquées dans les épisodes de proliférations et certaines espèces de bactéries. Cette spécificité s'expliquerait par les conditions différentes offertes par les diverses espèces de cyanobactéries associées aux épisodes de proliférations, à l'exemple de leur organisation cellulaire en filament plus ou moins agrégés ou en colonies ou de leurs capacités physiologiques telle que leur aptitude à fixer ou non l'azote atmosphérique.

Dans ce cadre général, nous nous sommes donc demandés :

- Si lors des proliférations de cyanobactéries, les communautés bactériennes associées à ces cyanobactéries sont différentes des communautés bactériennes considérées comme libres (ou non directement associées aux cyanobactéries)
- Si les communautés bactériennes associées aux cyanobactéries présentent des différences structurelles et fonctionnelles selon la cyanobactérie qui prolifère.

Le travail effectué durant ces trois années de thèse et les différentes approches utilisées ont permis d'apporter plusieurs éléments de réponses aux questions posées ci-dessus mais ils ont également soulevés de nombreuses questions et nous ont conduit à réfléchir aux limites des approches que nous avons mises en place puis à la proposition de nouvelles voies de recherche pour dépasser ces limites.

## **Question 1: Les communautés bactériennes associées aux cyanobactéries sont-elles différentes des communautés bactériennes libres?**

### **Eléments de réponse apportés par mes travaux:**

Nos travaux effectués en milieu naturel ont permis de révéler une grande richesse des communautés bactériennes associées aux cyanobactéries grâce à l'utilisation du séquençage à haut débit et d'amorces spécifiques permettant de limiter la proportion des séquences de cyanobactéries (section II-2). Sur la base de l'affiliation taxonomiques des bactéries associées et libres ainsi que leur distribution dans d'autres environnements par la comparaison de ces séquences avec celles présentes dans GenBank® nous avons pu observer que les interactions entre les cyanobactéries et les bactéries qui leur sont associées semblent être basées sur la dégradation de la matière organique et le recyclage de l'azote et ce indépendamment du genre de cyanobactéries qui prolifère. C'est ainsi qu'il est apparu que les bactéries dominantes vivant en association avec les cyanobactéries, appartiennent majoritairement aux groupes des  $\beta$ -proteobactéries et les Bacteroidetes dont l'importance relative est connue comme étant positivement corrélée aux taux de reminéralisation du carbone autant dans les milieux terrestres (e.g. Fierer et al. 2007), que marins (e.g. Mou et al. 2008) ou encore dans eaux douces (Newton et al. 2011). D'autre part, sur la base de quantification des groupes fonctionnels responsables de différentes étapes du cycle de l'azote (section III-2), nous avons pu révélé l'existence de différences significatives entre les deux fractions bactériennes. Les bactéries impliquées dans les étapes de la nitrification et de la dénitrification semblent être plus abondantes dans les fractions libres que dans les fractions associées, suggérant ainsi que le recyclage des substrats azotés est principalement réalisé par les communautés bactériennes libres plutôt que par les communautés associées aux cyanobactéries.

Nos travaux réalisés sur les cultures de cyanobactéries confirment globalement ces résultats. Dans cette expérimentation, nous avons considéré que toutes les bactéries appartenaient à la fraction associée car les seules sources de carbone dont elles disposaient étaient celles produites par les cyanobactéries. Comme pour les milieux naturels, il est apparu que les OTUs dominantes étaient des espèces ayant une forte affinité pour la matière organique. Plus précisément, ces espèces dominantes se partageaient entre des espèces « spécialistes » qui étaient

surtout retrouvées en association avec des cyanobactéries (ou des microalgues) et des espèces « généralistes » capables d'occuper tous les environnements riches en matière organique à l'exemple des boues de stations d'épuration ou l'intestin humain.

De l'ensemble de ces résultats, il apparaît donc que les communautés bactériennes placées sous l'influence directe des cyanobactéries (fraction associée) semblent structurellement et fonctionnellement différentes des communautés bactériennes qui ne subissent qu'une influence indirecte (fraction libre) et que le déterminisme de ces différences semble reposer sur la disponibilité de la matière organique et sur les capacités des bactéries à exploiter cette ressource. C'est ainsi qu'il semble permis de distinguer les bactéries de ces deux fractions libres et associées sur la base de stratégies de type  $r$ <sup>13</sup> et de type  $K$ <sup>14</sup> (Andrews & Harris 1986). Dans la fraction associée, les bactéries seraient plutôt de type  $r$  comme le révèlent par exemple les fortes abondances en  $\gamma$ -proteobactéries qui sont connues pour avoir des taux de croissance élevés (e.g. Eilers et al. 2000, Yokokawa et al. 2004, Šimek et al. 2006). En revanche dans la fraction libre (ou dans les écosystèmes d'eau douce pauvres en matière organique), les Actinobactéries sont souvent dominantes (e.g. Glöckner et al. 2000, Humbert et al. 2009), ces microorganismes étant quant à elles, connues pour avoir des vitesses de croissance très lentes (e.g. Šimek et al. 2006, Warnecke & Hess 2009).

Toutefois, distinguer catégoriquement les communautés bactériennes placées sous l'influence directe des cyanobactéries de celles qui ne le sont pas reste un exercice assez théorique en milieu naturel. En particulier, dans les écosystèmes aquatiques peu profonds tel que celui investi dans notre étude, l'intensité des proliférations de cyanobactéries va exercer une influence plus ou moins grande sur l'ensemble de la colonne d'eau, que ce soit en terme de quantité de matière organique générée mais aussi en termes de concentrations en oxygène, de pénétration de la lumière ou encore de variations du pH (Paerl & Otten 2013). Ainsi, les bactéries qui ne sont pas attachées aux cyanobactéries ou qui ne vivent pas à

---

<sup>13</sup> Les bactéries avec une stratégie de type  $r$  sont des bactéries à taux de croissance rapide, capables d'exploiter rapidement une ressource et/ou de coloniser de nouveaux environnements; ces bactéries s'observent généralement dans les milieux soumis à des fortes perturbations.

<sup>14</sup> Les bactéries avec une stratégie de type  $K$  présentent un taux de croissance plus faible et de faibles variations d'abondance; ces bactéries sont souvent observées dans les milieux présentant une stabilité importante.

leur proximité immédiate, seront quand même plus ou moins influencées par les proliférations de cyanobactéries. Ceci explique sans doute le fait que les fractions libres et les fractions associées diffèrent principalement en terme de proportion des groupes taxonomiques plutôt qu'en termes de présence ou d'absence de taxa spécifique. En toute vraisemblance, il existe des interactions entre les bactéries des deux fractions et parmi celles-ci, on peut penser par exemple que les capacités métaboliques à dégrader la matière organique des bactéries de la fraction associée rendent disponible les substrats qui sont ensuite exploités par les bactéries de la fraction libre qui assurent ainsi un recyclage des nutriments.

### **Limites des approches mises en œuvre lors de nos travaux:**

Lors de nos travaux et surtout lors de l'analyse de nos résultats, nous avons constaté un certain nombre de limites dans les approches mises en œuvre lors de cette thèse. Ainsi, par rapport à notre première question sur les différences éventuelles entre communautés associées ou libres, trois points nous semblent intéressant à discuter.

Le premier d'entre eux concerne les méthodologies utilisées pour échantillonner les deux fractions. En effet, dans le but de différencier les fractions bactériennes associées aux cyanobactéries et celles considérées comme libres dans les milieux naturels, des filtrations différentielles ont été réalisées. Cette approche était cruciale pour notre travail et elle comportait plusieurs limites pouvant conduire à des biais dans la différenciation des deux fractions bactériennes. Par exemple, considérant que la phycosphère contient des bactéries qui sont localisées dans la proximité immédiate des cyanobactéries sans être cependant attachées à ces microorganismes, notre protocole de filtration conduisait à concentrer ces bactéries dans la fraction considérée comme libre. Par ailleurs, il est connu que dans les milieux naturels, les bactéries ne sont pas uniquement associées aux cyanobactéries car elles s'agrègent également autour de particules de différents types (e.g. Riemann & Winding 2001, Tang et al. 2009, 2011) qui, selon leur taille, pouvaient se retrouver dans la fraction libre ou associée. Malgré ces limites, notre stratégie d'échantillonnage a permis d'obtenir des résultats répétables comme l'a montré la grande cohérence des résultats obtenus sur les échantillonnages réalisés pendant trois jours successifs.

Le second point discutable dans notre protocole d'étude concerne les dates d'échantillonnage. Nos travaux en milieux naturels et sur les cultures ont reposé sur des échantillonnages ponctuels (même si ceux-ci ont été répétés sur trois jours en milieux naturels). Ces échantillonnages ne permettent donc pas d'avoir une estimation de l'évolution des communautés au cours du développement des proliférations alors que cette connaissance aurait pu nous permettre de mieux comprendre l'influence directe et indirecte des cyanobactéries sur les communautés associées et libres. Par ailleurs, il est connu que différents processus tels que le parasitisme viral peuvent avoir une influence importante dans la composition des communautés bactériennes (e.g. Jacquet et al. 2013) et ainsi engendrer des facteurs de confusion dans les comparaisons qui ont été réalisées (Bouvier & Del Giorgio 2007).

Enfin, le dernier point qui nous semble important concerne le fait que toutes nos données se base sur l'étude de l'ADN alors que des études récentes ont montré l'importance d'identifier les bactéries actives au sein des communautés (e.g. Lennon & Jones 2011). En effet, les microorganismes les plus abondants dans un écosystème ne sont pas toujours les plus actifs, que ce soit en terme de croissance (e.g. Campbell & Kirchman 2012) ou d'activités métaboliques spécifiques (e.g. Gifford et al. 2013).

### **Les nouvelles voies de recherche à développer sur cette première question:**

Au niveau des protocoles méthodologiques, Il n'existe pas, à notre connaissance, de méthode permettant de séparer parfaitement les différentes fractions (libres ou attachées). Cependant, des améliorations pourraient être apportées à notre approche, notamment pour la phase de concentration des bactéries dans la fraction associée. Certains auteurs appliquent en effet, un processus de sonication douce afin de détacher les bactéries (Worm & Søndergaard 1998, Parveen et al. 2013). Cette procédure combinée à notre méthode de filtration permettrait probablement de mieux séparer les cyanobactéries des bactéries qui leur sont associées et donc de disposer d'ADN «bactériens» moins contaminés par celui des cyanobactéries permettant ainsi de mieux décrire la diversité structurelle et fonctionnelle des bactéries associées aux cyanobactéries.

Par ailleurs, nos données ne nous ont permis d'obtenir une image de la phycosphère qu'à un moment précis de la prolifération alors que plusieurs études



(e.g. Shi et al. 2011, Parveen et al. 2013) ont montré que la structure de cette phycosphère cyanobactérienne évolue pendant la dynamique de la prolifération en milieu naturel. Un suivi temporel nous semble donc constituer une perspective prioritaire afin d'évaluer l'impact du développement des proliférations de cyanobactéries sur la diversité structurelle et fonctionnelle du bactérioplancton associé ou non associé. Nous proposons un suivi au cours d'une saison de prolifération avec un pas de temps d'échantillonnage de type hebdomadaire. Ainsi, il devrait être possible d'évaluer si une transition entre les groupes taxonomiques et/ou fonctionnels s'opère dans les différentes fractions au cours des diverses phases de la prolifération.

Enfin, pour mieux évaluer la diversité structurelle et fonctionnelle des communautés bactériennes et surtout l'abondance relative des diverses espèces, il serait intéressant de procéder à des quantifications par qPCR (i) des principaux clusters retrouvés dans les eaux douces (Newton et al. 2011) et (ii) des principaux groupes fonctionnels impliqués dans le cycle de l'azote. Il est en effet connu que le séquençage ne permet pas d'estimer de façon satisfaisante l'abondance relative des OTUs sur la seule base du nombre de séquences obtenus (Amend et al. 2010). L'utilisation conjointe de la qPCR et du séquençage à haut débit sur les communautés bactériennes des fractions associées et libres durant les différentes phases des proliférations de cyanobactéries combinée à une caractérisation physico-chimique des écosystèmes (notamment des concentrations en nutriments) ainsi que la quantité et la qualité de la matière organique nous permettrait probablement de mieux comprendre la dynamique des communautés microbiennes ainsi que les interactions possibles existant entre les différents groupes fonctionnels, notamment entre microorganismes phototrophes et hétérotrophes.

## **Question 2: les communautés bactériennes associées aux cyanobactéries présentent-elles des différences selon la cyanobactérie qui prolifère?**

### **Eléments de réponse apportés par mes travaux:**

En milieu naturel, la comparaison entre des phycosphères de deux genres de cyanobactéries différents nous a permis de mettre en évidence des différences dans la structure et la composition des communautés bactériennes associées à *Anabaena* sp. et à *Microcystis* sp.. Nous avons pu observer que certains groupes

taxonomiques (e.g. importante abondance des Verrucomicrobia pour les échantillons d'*Anabaena* et des Nitrosomonadales pour les échantillons de *Microcystis*) semblent être plus spécifiquement associés à un genre de cyanobactéries. La qualité de la matière organique ainsi que la disponibilité des composés azotés semblait jouer un rôle dans ces associations. En revanche, aucune différence significative n'a été observée dans l'abondance des bactéries nitrifiantes et dénitrifiantes que la cyanobactérie ait la capacité ou non de fixer l'azote atmosphérique. Concernant les communautés fixatrices de l'azote atmosphérique, une plus forte abondance de gènes *nifH* a été observée par qPCR dans les fractions libres et attachées des communautés bactériennes associées à *Anabaena* mais le séquençage des fragments de ce gène a révélé que presque toutes les séquences étaient affiliées à cette cyanobactérie. Pour la prolifération de *Microcystis*, une moindre abondance de gènes *nifH* a été observée par qPCR dans les deux fractions en comparaison de celle estimée chez *Anabaena*. En revanche, une grande diversité de séquences du gène *nifH* a été observée dans la communauté bactérienne des fixateurs d'azote associée à *Microcystis*. Il faut cependant être prudent dans l'interprétation de ces résultats car notre faible profondeur de séquençage combinée à la surreprésentation des gènes *nifH* de *Anabaena*, ne nous a pas permis de caractériser les bactéries fixatrices d'azote associée à cette cyanobactérie et donc de comparer les deux communautés bactériennes associées aux deux genres.

Par ailleurs, l'interprétation de nos résultats présente également des limites du au fait que les prélèvements pendant les deux proliférations avaient été réalisés à différentes phases (l'une au cours de la croissance de la cyanobactéries, l'autre pendant la décroissance) et sachant également que les conditions environnementales pendant ces deux proliférations étaient différentes ce qui pouvait avoir une influence sur les communautés bactériennes. C'est pourquoi, dans le but de mieux déterminer l'influence directe exercée par les cyanobactéries sur les bactéries qui leur sont associées, nous avons développer des travaux sur des souches de cyanobactéries en culture (section II-3). Nous avons comparé les diversités structurelles et fonctionnelles des communautés bactériennes associées à quinze souches de cyanobactéries n'ayant jamais été axénisées. Nous avons également utilisés deux échantillons prélevés dans le lac où deux des souches en culture étudiées avaient été isolées. Grâce à cette approche, nous avons pu établir que les communautés bactériennes qui sont sous l'influence directe des souches de

cyanobactéries hétérocystées (*Aphanizomenon* - *Anabaena*), sont significativement différentes dans leur composition et dans leur capacité à utiliser différentes sources de carbone des communautés bactériennes associées aux souches non-hétérocystées (*Planktothrix* - *Microcystis*). La comparaison des communautés bactériennes dans les souches cultivées et dans les échantillons issus du milieu naturel a permis de confirmer l'existence d'interactions négatives entre les cyanobactéries et les Actinobactéries qui étaient pratiquement absentes des cultures et très peu présentes dans les échantillons d'eau du lac.

Dans les cultures comme dans les milieux naturels, les OTUs dominantes étaient soit des espèces spécialistes, soit des espèces généralistes (voir question n°1). La présence de ces deux types de bactéries généralistes et spécialistes qui semblent avoir des besoins nutritionnels semblables suggère que ces deux groupes ont des niches qui se chevauchent. Généralement, les groupes d'espèces ayant des exigences nutritionnelles similaires appartiennent à des «guildes écologiques», si elles vivent dans les mêmes niches écologiques ou dans des niches écologiques qui se chevauchent (Hutchinson 1957, Wilson 1999). Ce chevauchement de niche impliquerait que ces guildes pourraient se trouver en compétition pour les ressources offertes par les cyanobactéries ce qui expliquerait le maintien d'une grande diversité au sein des communautés bactériennes de la phycosphère que ce soit en milieu naturel ou en milieu de culture (Kassen 2002). D'autres processus peuvent également contribuer à expliquer cette grande diversité qui n'était pas attendue dans les cultures, à l'exemple de la complémentarité entre espèces qui serait nécessaire pour exploiter les sources de carbone disponibles (e.g. Cottrell & Kirchman 2000) ou le parasitisme viral qui est un processus connu pour permettre le maintien d'une grande diversité dans les communautés bactériennes (Sime-Ngando 2014).

Concernant les différences observées dans les communautés bactériennes en fonction des genres de cyanobactéries, celles-ci pourraient s'expliquer par des différences dans la qualité de la matière organique produite par ces genres et par les capacités différentes des communautés associées à utiliser ces différentes sources de carbone (e.g. Teeling et al. 2012). La phycosphère semble donc contenir un mélange dynamique d'espèces bactériennes étant considérées comme des bactéries spécialistes ayant une forte affinité pour des ressources carbonées

spécifiquement produites par certaines cyanobactéries et comme des bactéries généralistes capables d'utiliser des sources de carbone très variées.

### **Limites des approches mises en œuvre lors de nos travaux:**

Le modèle des cultures de cyanobactéries avait déjà été utilisé pour étudier les communautés bactériennes qui leur sont associées (e.g. Dziallas & Grossart 2011, 2012, Shi et al. 2011, Bagatini et al. 2014), et les inconvénients potentiels de cette approche avait déjà été décrits par certains auteurs (e.g. Ferguson et al. 1984, Šimek et al. 2005, Sapp et al. 2007). L'un des inconvénients majeurs évoqués lors de l'utilisation de cultures est que les communautés en culture présenteraient une moindre richesse structurale et fonctionnelle que les communautés bactériennes des milieux naturels car seules les espèces microbiennes ayant les capacités de croître en milieu de culture parviendraient à se maintenir et se développer. Cependant, de façon surprenante, nos résultats n'ont pas révélé une moindre richesse dans communautés bactériennes associées aux cultures en comparaison de celles des milieux naturels en période de proliférations. Il faut cependant considérer que même si les nouvelles approches de séquençage permettent d'obtenir des profondeurs de séquençage plus grandes et donc de mieux décrire les communautés microbiennes, en particulier les espèces rares (Sogin et al. 2006), la taille ainsi que le rôle écologique de cette «rare biosphère» reste difficile à évaluer (Pedrós-Alió 2006) et elle est peut être très différente entre communautés cultivées et communautés naturelles (Shade et al. 2012). C'est pourquoi, la double approche menée en système naturel et en culture nous semble intéressante à poursuivre.

L'utilisation des Ecoplates comporte quant à elle certaines limites dont la principale est qu'elle ne fournit qu'une image très partielle des capacités métaboliques des communautés microbiennes, notamment en raison du choix et de la diversité des substrats carbonés testés (Christian & Lind 2006). Par ailleurs, plusieurs étapes peuvent être critiquées lors de l'utilisation des Ecoplates à l'exemple de la densité de l'inoculum ou des temps d'incubation qui introduisent des biais importants pouvant influencer significativement les résultats obtenus (Preston-Mafham et al. 2002).

### **Les nouvelles voies de recherche à développer sur cette seconde question:**

Plusieurs de nos conclusions et de nos hypothèses formulées ci-dessus reposent sur la quantité et la qualité de la matière organique disponible. Ces conclusions sont notamment basées sur certaines études qui ont montré que la matière organique dissoute produite par les cyanobactéries varie en terme de qualité et de quantité au cours de leur prolifération mais aussi en fonction de l'affiliation phylogénétique des cyanobactéries (e.g. Leloup et al. 2013, Becker et al. 2014). C'est pourquoi si l'on veut mieux comprendre les changements intervenants dans les communautés bactériennes associées aux cyanobactéries, il nous semble prioritaire de caractériser la matière organique par exemple par utilisation de Chromatographie en Liquide Haute Pression couplé à la spectrométrie de masse (HPLC-MS) ou encore par spectrophotométrie suite au fractionnement de la matière organique en fonction de son hydrophobicité. Or, cette caractérisation peut être difficile à réaliser en milieu naturel. En effet, la matière organique en milieu lacustre eutrophe peut être d'origine naturelle (allochtone et autochtone) ou d'origine anthropique ce qui la rend extrêmement complexe (Gondar et al. 2008). C'est pourquoi, dans un premier temps, il nous semble plus approprié de réaliser cette approche sur des souches en culture avant de passer au milieu naturel. De plus, en milieux de culture, l'utilisation de dispositif tel que les sacs de dialyse proposé par Dziallas & Grossart (2011) nous paraît très intéressante pour notre questionnement. En effet, grâce à ce dispositif, il serait possible d'utiliser des exsudats de cultures axéniques de différentes cyanobactéries comme source de carbone pour les bactéries hétérotrophes et ainsi d'évaluer l'effet ces différents exsudats cyanobactériens sur la composition des communautés bactériennes.

Par ailleurs, comme déjà mentionné au préalable, se baser uniquement sur l'ADN pour les analyses des communautés bactériennes ne permet pas de déterminer quelles sont les bactéries actives et celles qui ne le sont pas. Grâce à la métatranscriptomique<sup>15</sup> (Poretsky et al. 2005) il serait possible de révéler quels sont les gènes impliqués dans l'utilisation des composés organiques par les groupes taxonomiques spécialistes et généralistes (e.g. Gifford et al. 2013) et quelle est leur distribution au sein des communautés bactériennes de la phycosphère. L'application de ce type d'approche représente cependant encore certaines difficultés liées au fait

---

<sup>15</sup> Analyse de l'ensemble de l'ARNm d'une communauté bactérienne d'un échantillon.

que pour la plupart des bactéries vivant dans les milieux naturels, l'absence de génomes de référence dans les bases de données conduit à se retrouver avec une large proportion d'ARNm non-assignés (Pascual et al. 2014).

Enfin, il nous semble intéressant de poursuivre les investigations sur les différentes étapes du recyclage de l'azote au sein des communautés bactériennes de la phycosphères des cyanobactéries fixatrices et non fixatrices d'azote atmosphérique. En effet, les résultats obtenus lors de nos travaux ouvrent des perspectives intéressantes à l'exemple de la grande diversité des diazotrophes retrouvée lors de la prolifération de *Microcystis*. Ce résultat suggère que cette cyanobactérie non fixatrice d'azote atmosphérique pourrait bénéficier d'apport en azote grâce à ces bactéries fixatrices. Pour aller plus loin dans ces travaux, nous proposons deux approches complémentaires. Il serait intéressant d'évaluer l'apport en azote des communautés diazotrophes au cours des proliférations des cyanobactéries par la mesure du taux de fixation d'azote soit indirectement par le dosage de réduction de l'acétylène (Stewart et al. 1967), soit directement par le dosage du traceur  $^{15}\text{N}_2$  (Montoya et al. 1996). La deuxième approche proposée consiste à évaluer l'activité des différents groupes de fixateur d'azote atmosphériques par la quantification des transcrit du gène *nifH*. En effet, la grande diversité des bactéries diazotrophes, dont certaines caractérisé demandent des conditions anaérobiques pour être actives, reste difficile à interpréter en se basant uniquement sur l'ADN et sur des points d'échantillonnage ponctuels. Une quantification par qPCR sur les ADN des différents groupes de diazotrophes au cours de proliférations de cyanobactéries fixatrice et non-fixatrice d'azote atmosphérique couplée à une évaluation de leur activité réalisée par qPCR sur les ARNm nous permettrait de mieux comprendre la dynamique et l'activité de ces bactéries et leur potentielles interactions avec celle de la cyanobactérie à laquelle elles sont associées. S'il existe peu de données disponibles sur ces questions dans les écosystèmes d'eau douce, les travaux en milieux marins montrent combien ces approches sont intéressantes pour mieux comprendre le cycle de l'azote (e.g. Moisander et al. 2014).



## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Amend AS, Seifert KA, Bruns TD** (2010) Quantifying microbial communities with 454 pyrosequencing: does read abundance count? *Mol Ecol* **19**:5555–5565
- Andrews J, Harris R** (1986) r- and K-Selection and Microbial Ecology. In: Marshall KC (ed) *Advances in Microbial Ecology* SE - 3. Springer US, p 99–147
- Bagatini IL, Eiler A, Bertilsson S, Klaveness D, Tessarolli LP, Vieira AAH** (2014) Host-specificity and dynamics in bacterial communities associated with bloom-forming freshwater phytoplankton. *PLoS One* **9**:e85950
- Becker JW, Berube PM, Follett CL, Waterbury JB, Chisholm SW, DeLong EF, Repeta DJ** (2014) Closely related phytoplankton species produce similar suites of dissolved organic matter. *Front Microbiol* **5**:1–14
- Bouvier T, Del Giorgio PA** (2007) Key role of selective viral-induced mortality in determining marine bacterial community composition. *Environ Microbiol* **9**:287–297
- Campbell BJ, Kirchman DL** (2012) Bacterial diversity, community structure and potential growth rates along an estuarine salinity gradient. *ISME J* **7**:210–220
- Christian BW, Lind OT** (2006) Key Issues Concerning Biolog Use for Aerobic and Anaerobic Freshwater Bacterial Community-Level Physiological Profiling. *Int Rev Hydrobiol* **91**:257–268
- Cottrell MT, Kirchman DL** (2000) Natural Assemblages of Marine Proteobacteria and Members of the Cytophaga-Flavobacter Cluster Consuming Low- and High-Molecular-Weight Dissolved Organic Matter. *Appl Environ Microbiol* **66**:1692–1697
- Dziallas C, Grossart HP** (2011) Temperature and biotic factors influence bacterial communities associated with the cyanobacterium *Microcystis* sp. *Environ Microbiol* **13**:1632–1641
- Dziallas C, Grossart HP** (2012) Microbial interactions with the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* and their dependence on temperature. *Mar Biol* **159**:2389–2398
- Eilers H, Pernthaler J, Amann R** (2000) Succession of pelagic marine bacteria during enrichment: A close look at cultivation-induced shifts. *Appl Environ Microbiol* **66**:4634–4640
- Ferguson RL, Buckley EN, Palumbo AV** (1984) Response of marine bacterioplankton to differential filtration and confinement. *Appl Environ Microbiol* **47**:49–55
- Fierer N, Bradford MA, Jackson RB** (2007) Toward an ecological classification of soil bacteria. *Ecology* **88**:1354–64
- Gifford SM, Sharma S, Booth M, Moran MA** (2013) Expression patterns reveal niche diversification in a marine microbial assemblage. *ISME J* **7**:281–298
- Glöckner FO, Zaichikov E, Belkova N, Denissova L, Pernthaler J, Pernthaler A, Amann R** (2000) Comparative 16S rRNA analysis of lake bacterioplankton reveals globally distributed phylogenetic clusters including an abundant group of actinobacteria. *Appl Environ Microbiol* **66**:5053–65



- Gondar D, Thacker SA, Tipping E, Baker A** (2008) Functional variability of dissolved organic matter from the surface water of a productive lake. *Water Res* **42**:81–90
- Humbert JF, Dorigo U, Cecchi P, Le Berre B, Debroas D, Bouvy M** (2009) Comparison of the structure and composition of bacterial communities from temperate and tropical freshwater ecosystems. *Environ Microbiol* **11**:2339–2350
- Hutchinson GE** (1957) Concluding remarks. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **22**:415–427
- Jacquet S, Domaizon I, Chardon C, Personnic S** (2013) Are Small Grazers and/or Viruses a Structuring Factor of the Free-Living Bacterial Community in Lake Geneva? *Adv Microbiol* **3**:233–248
- Kassen R** (2002) The experimental evolution of specialists, generalists, and the maintenance of diversity. *J Evol Biol* **15**:173–190
- Leloup M, Nicolau R, Pallier V, Yéprémian C, Feuillade-Cathalifaud G** (2013) Organic matter produced by algae and cyanobacteria: Quantitative and qualitative characterization. *J Environ Sci (China)* **25**:1089–1097
- Lennon JT, Jones SE** (2011) Microbial seed banks: the ecological and evolutionary implications of dormancy. *Nat Rev Microbiol* **9**:119–130
- Moisander PH, Serros T, Paerl RW, Beinart RA, Zehr JP** (2014) Gammaproteobacterial diazotrophs and *nifH* gene expression in surface waters of the South Pacific Ocean. *ISME J* **8**:1–12
- Montoya JP, Voss M, Kahler P, Capone DG** (1996) A Simple, High-Precision, High-Sensitivity Tracer Assay for N<sub>2</sub> Fixation. *Appl Environ Microbiol* **62**:986–993
- Mou X, Sun S, Edwards RA, Hodson RE, Moran MA** (2008) Bacterial carbon processing by generalist species in the coastal ocean. *Nature* **451**:708–11
- Newton RJ, Jones SE, Eiler A, McMahon KD, Bertilsson S** (2011) A guide to the natural history of freshwater lake bacteria. *Microbiol Mol Biol Rev.* **75**:14–49
- Paerl HW, Otten TG** (2013) Harmful Cyanobacterial Blooms: Causes, Consequences, and Controls. *Microb Ecol* **65**:995–1010
- Parveen B, Ravet V, Djediat C, Mary I, Quiblier C, Debroas D, Humbert JF** (2013) Bacterial communities associated with *Microcystis* colonies differ from free-living communities living in the same ecosystem. *Environ Microbiol Rep* **5**:716–724
- Pascualt N, Loux V, Derozier S, Martin V, Debroas D, Maloufi S, Humbert JF, Leloup J** (2014) Technical challenges in metatranscriptomic studies applied to the bacterial communities of freshwater ecosystems. *Genetica*:157–167
- Pedrós-Alió C** (2006) Marine microbial diversity: can it be determined? *Trends Microbiol* **14**:257–263
- Poretsky RS, Bano N, Buchan A, Kleikemper J, Pickering M, Pate WM, Moran MA, Hollibaugh JT, Leclerc G** (2005) Analysis of Microbial Gene Transcripts in Environmental Samples. *Appl Environ Microbiol* **71**:4121–4126
- Preston-Mafham J, Boddy L, Randerson PF** (2002) Analysis of microbial community functional diversity using sole-carbon-source utilisation profiles - a critique. *FEMS Microbiol Ecol* **42**:1–14

- Riemann L, Winding A** (2001) Community Dynamics of Free-living and Particle-associated Bacterial Assemblages during a Freshwater Phytoplankton Bloom. *Microb Ecol* **42**:274–285
- Sapp M, Wichels A, Gerdts G** (2007) Impacts of cultivation of marine diatoms on the associated bacterial community. *Appl Environ Microbiol* **73**:3117–20
- Shade A, Hogan CS, Klimowicz AK, Linske M, Mcmanus PS, Handelsman J** (2012) Culturing captures members of the soil rare biosphere. *Environ Microbiol* **14**:2247–2252
- Shi L, Cai Y, Kong F, Yu Y** (2011) Changes in abundance and community structure of bacteria associated with buoyant *Microcystis* colonies during the decline of cyanobacterial bloom (autumn–winter transition). *Ann Limnol - Int J Limnol* **47**:355–362
- Sime-Ngando T** (2014) Environmental bacteriophages: Viruses of microbes in aquatic ecosystems. *Front Microbiol* **5**:1–14
- Šimek K, Horňák K, Jezbera J, Mašín M, Nedoma J, Gasol JM, Schauer M** (2005) Influence of top-down and bottom-up manipulations on the R-BT065 subcluster of  $\beta$ -proteobacteria, an abundant group in bacterioplankton of a freshwater reservoir. *Appl Environ Microbiol* **71**:2381–2390
- Šimek K, Horňák K, Jezbera J, Nedoma J, Vrba J, Straškrábová V, Macek M, Dolan JR, Hahn MW** (2006) Maximum growth rates and possible life strategies of different bacterioplankton groups in relation to phosphorus availability in a freshwater reservoir. *Environ Microbiol* **8**:1613–1624
- Sogin ML, Morrison HG, Huber JA, Welch DBM, Huse SM, Neal PR, Arrieta JM, Herndl GJ** (2006) Microbial Diversity in the Deep Sea and the Underexplored “Rare Biosphere.” *Proc Natl Acad Sci USA* **103**:12115–12120
- Stewart WD, Fitzgerald GP, Burris RH** (1967) In situ studies on  $N_2$  fixation using the acetylene reduction technique. *Proc Natl Acad Sci USA* **58**:2071–2078
- Tang KW, Dziallas C, Grossart HP** (2011) Zooplankton and aggregates as refuge for aquatic bacteria: protection from UV, heat and ozone stresses used for water treatment. *Environ Microbiol* **13**:378–90
- Tang X, Gao G, Qin B, Zhu L, Chao J, Wang J, Yang G** (2009) Characterization of bacterial communities associated with organic aggregates in a large, shallow, eutrophic freshwater lake (Lake Taihu, China). *Microb Ecol* **58**:307–22
- Teeling H, Fuchs BM, Becher D, Klockow C, Gardebrecht A, Bennke CM, Kassabgy M, Huang S, Mann AJ, Waldmann J, Weber M, Klindworth A, Otto A, Lange J, Bernhardt J, Reinsch C, Hecker M, Peplies J, Bockelmann FD, Callies U, Gerdts G, Wichels A, Wiltshire KH, Glöckner FO, Schweder T, Amann R** (2012) Substrate-controlled succession of marine bacterioplankton populations induced by a phytoplankton bloom. *Science* **336**:608–611
- Warnecke F, Hess M** (2009) A perspective: metatranscriptomics as a tool for the discovery of novel biocatalysts. *J Biotechnol* **142**:91–5
- Wilson JB** (1999) Guilds , Functional Types and Ecological Groups. *Oikos* **86**:507–522
- Worm J, Søndergaard M** (1998) Dynamics of heterotrophic bacteria attached to *Microcystis* spp. (Cyanobacteria). *Aquat Microb Ecol* **14**:19–28
- Yokokawa T, Nagata T, Cottrell MT, Kirchman DL** (2004) Growth rate of the major phylogenetic bacterial groups in the Delaware estuary. *Limnol Oceanogr* **49**:1620–1629







## **V. REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES**

---



- Amin SA, Hmelo LR, van Tol HM, Durham BP, Carlson LT, Heal KR, Morales RL, Berthiaume CT, Parker MS, Djunaedi B, Ingalls AE, Parsek MR, Moran MA, Armbrust EV** (2015) Interaction and signalling between a cosmopolitan phytoplankton and associated bacteria. *Nature* **522**:98–101
- van Apeldoorn ME, van Egmond HP, Speijers GJA, Bakker GJI** (2007) Toxins of cyanobacteria. *Mol Nutr Food Res* **51**:7–60
- Azam F, Fenchel T, Field J, Gray J, Meyer-Reil L, Thingstad F** (1983) The Ecological Role of Water-Column Microbes in the Sea. *Mar Ecol Prog Ser* **10**:257–263
- Azam F, Malfatti F** (2007) Microbial structuring of marine ecosystems. *Nat Rev Microbiol* **5**:782–791
- Bell WH, Lang JM, Mitchell R** (1974) Selective stimulation of marine bacteria by algal extracellular products. *Limnol Oceanogr* **19**:833–839
- Bell W, Mitchell R** (1972) Chemotactic and growth responses of marine bacteria to algal extracellular products. *Biol Bull* **143**:265–277
- Berg KA, Lyra C, Sivonen K, Paulin L, Suomalainen S, Tuomi P, Rapala J** (2009) High diversity of cultivable heterotrophic bacteria in association with cyanobacterial water blooms. *ISME J* **3**:314–325
- Beverdors LJ, Miller TR, McMahon KD** (2013) The role of nitrogen fixation in cyanobacterial bloom toxicity in a temperate, eutrophic lake. *PLoS One* **8**:e56103
- Brauer VS, Stomp M, Bouvier T, Fouilland E, Leboulanger C, Confurius-Guns V, Weissing FJ, Stal L, Huisman J** (2015) Competition and facilitation between the marine nitrogen-fixing cyanobacterium *Cyanothece* and its associated bacterial community. *Front Microbiol* **5**:1–14
- Brauman KA, Daily GC, Duarte TK, Mooney HA** (2007) The Nature and Value of Ecosystem Services: An Overview Highlighting Hydrologic Services. *Annu Rev Environ Resour* **32**:67–98
- Brunberg A** (1999) Contribution of bacteria in the mucilage of *Microcystis* spp. (Cyanobacteria) to benthic and pelagic bacterial production in a hypereutrophic lake. *FEMS Microbiol Ecol* **29**:13–22
- Buchan A, LeClerc GR, Gulvik CA, González JM** (2014) Master recyclers: features and functions of bacteria associated with phytoplankton blooms. *Nat Rev Microbiol* **12**:686–698
- Cai H, Yan Z, Wang A, Krumholz LR, Jiang HL** (2013) Analysis of the attached microbial community on mucilaginous cyanobacterial aggregates in the eutrophic Lake Taihu reveals the importance of Planctomycetes. *Microb Ecol* **66**:73–83
- Caldwell Eldridge SL, Wood TM, Echols KR, Topping BR** (2013) Microcystins, nutrient dynamics, and other environmental factors during blooms of non-microcystin-producing *Aphanizomenon flos-aquae* in Upper Klamath Lake, Oregon, 2009. *Lake Reserv Manag* **29**:68–81
- Cannell RJP, Owsianka AM, Walker JM** (1988) Results of a large-scale screening programme to detect antibacterial activity from freshwater algae. *Br Phycol J* **23**:41–44
- Capone DG, Ferrier MD, Carpenter EJ** (1994) Amino-Acid Cycling in Colonies of the Planktonic Marine Cyanobacterium *Trichodesmium-Thiebautii*. *Appl Environ Microbiol* **60**:3989–3995



- Chaffin JD, Bridgeman TB** (2014) Organic and inorganic nitrogen utilization by nitrogen-stressed cyanobacteria during bloom conditions. *J Appl Phycol* **25**:299–309
- Cole JJ** (1982) Interactions Between Bacteria and Algae in Aquatic Ecosystems. *Annu Rev Ecol Syst* **13**:291–314
- Cole JJ, Prairie YT, Caraco NF, McDowell WH, Tranvik LJ, Striegl RG, Duarte CM, Kortelainen P, Downing JA, Middelburg JJ, Melack J** (2007) Plumbing the global carbon cycle: Integrating inland waters into the terrestrial carbon budget. *Ecosystems* **10**:171–184
- Coles JF, Jones RC** (2000) Effect of temperature on photosynthesis-light response and growth of four phytoplankton species isolated from a tidal freshwater river. *J Phycol* **36**:7–16
- Dolman AM, Rücker J, Pick FR, Fastner J, Rohrlack T, Mischke U, Wiedner C** (2012) Cyanobacteria and cyanotoxins: the influence of nitrogen versus phosphorus. *PLoS One* **7**:e38757
- Donald DB, Bogard MJ, Finlay K, Leavitt PR** (2011) Comparative effects of urea, ammonium, and nitrate on phytoplankton abundance, community composition, and toxicity in hypereutrophic freshwaters. *Limnol Oceanogr* **56**:2161–2175
- Downing JA, McCauley E** (1992) The nitrogen:phosphorus relationship in lakes. *Limnology Oceanogr* **37**:936–945
- Dziallas C, Grossart HP** (2011) Temperature and biotic factors influence bacterial communities associated with the cyanobacterium *Microcystis* sp. *Environ Microbiol* **13**:1632–1641
- Eiler A, Bertilsson S** (2004) Composition of freshwater bacterial communities associated with cyanobacterial blooms in four Swedish lakes. *Environ Microbiol* **6**:1228–43
- Eiler A, Olsson JA, Bertilsson S** (2006) Diurnal variations in the auto- and heterotrophic activity of cyanobacterial phycospheres (*Gloeotrichia echinulata*) and the identity of attached bacteria. *Freshw Biol* **51**:298–311
- Elliott JA** (2012) Is the future blue-green? A review of the current model predictions of how climate change could affect pelagic freshwater cyanobacteria. *Water Res* **46**:1364–1371
- Fallon RD, Brock TD** (1979) Lytic organisms and photooxidative effects: Influence on blue-green algae (cyanobacteria) in Lake Mendota, Wisconsin. *Appl Environ Microbiol* **38**:499–505
- Ferber LR, Levine SN, Lini A, Livingston GP** (2004) Do cyanobacteria dominate in eutrophic lakes because they fix atmospheric nitrogen? *Freshw Biol* **49**:690–708
- Field CB, Behrenfeld MJ, Randerson JT, Falkowski P** (1998) Primary Production of the Biosphere: Integrating Terrestrial and Oceanic Components. *Science* **281**:237–240
- Finlay K, Patoine A, Donald DB, Bogard MJ, Leavitt PR** (2010) Experimental evidence that pollution with urea can degrade water quality in phosphorus-rich lakes of the Northern Great Plains. *Limnol Oceanogr* **55**:1213–1230
- Gan N, Xiao Y, Zhu L, Wu Z, Liu J, Hu C, Song L** (2012) The role of microcystins in maintaining colonies of bloom-forming *Microcystis* spp. *Environ Microbiol* **14**:730–42
- Garcia-Pichel F, Castenholz RW** (1993) Occurrence of UV-absorbing, mycosporine-like compounds among cyanobacterial isolates and an estimate of their screening capacity. *Appl Environ Microbiol* **59**:163–169

- Gleick PH** (1996) Water resources. *Encycl Clim Weather*:817–823
- Glibert PM, Bronk DA** (1994) Release of dissolved organic nitrogen by marine diazotrophic cyanobacteria, *Trichodesmium spp.* *Appl Environ Microbiol* **60**:3996–4000
- de Groot R, Brander L, van der Ploeg S, Costanza R, Bernard F, Braat L, Christie M, Crossman N, Ghermandi A, Hein L, Hussain S, Kumar P, McVittie A, Portela R, Rodriguez LC, ten Brink P, van Beukering P** (2012) Global estimates of the value of ecosystems and their services in monetary units. *Ecosyst Serv* **1**:50–61
- Grossart HP, Czub G, Simon M** (2006) Algae-bacteria interactions and their effects on aggregation and organic matter flux in the sea. *Environ Microbiol* **8**:1074–1084
- Grossart HP, Levold F, Allgaier M, Simon M, Brinkhoff T** (2005) Marine diatom species harbour distinct bacterial communities. *Environ Microbiol* **7**:860–873
- Gumbo JR, Colet TE** (2011) Light and electron microscope assessment of the lytic activity of *Bacillus* on *Microcystis aeruginosa*. *african J Biotechnol* **10**:8054–8063
- Hansson LA, Gustafsson S, Rengefors K, Bomark L** (2007) Cyanobacterial chemical warfare affects zooplankton community composition. *Freshw Biol* **52**:1290–1301
- Herrero A, Muro-pastor AM, Flores E, Herrero A, Muro-pastor AM, Flores E** (2001) Nitrogen Control in Cyanobacteria. *J Bacteriol* **183**:411–425
- Hewson I, Poretsky RS, Dyhrman ST, Zielinski B, White AE, Tripp HJ, Montoya JP, Zehr JP** (2009) Microbial community gene expression within colonies of the diazotroph, *Trichodesmium*, from the Southwest Pacific Ocean. *ISME J* **3**:1286–1300
- Hietanen S, Lehtimäki J, Tuominen L, Sivonen K, Kuparinen J** (2002) *Nodularia spp.* (Cyanobacteria) incorporate leucine but not thymidine: importance for bacterial-production measurements. *Aquat Microb Ecol* **28**:99–104
- Hooper DU, Chapin III FS, Ewel JJ, Hector A, Inchausti P, Lavorel S, Lawton JH, Lodge DM, Loreau M, Naeem S, Schmid B, Setälä H, Symstad AJ, Vandermeer J, Wardle DA** (2005) ESA Report. *Ecological Monographs* **75**:3-35
- Howarth RW, Marino R, Lane J, Cole JJ** (1988) Nitrogen fixation in freshwater, estuarine, and marine ecosystems. 1. Rates and importance. *Limnol Oceanogr* **33**:669–687
- Ibelings BW, Mur LR, Walsby AE** (1991) Diurnal Changes in Buoyancy and Vertical-Distribution in Populations of *Microcystis* in 2 Shallow Lakes. *J Plankton Res* **13**:419–436
- Jacquet S, Briand JF, Leboulanger C, Avois-Jacquet C, Oberhaus L, Tassin B, Vinçon-Leite B, Paolini G, Druart JC, Anneville O, Humbert JF** (2005) The proliferation of the toxic cyanobacterium *Planktothrix rubescens* following restoration of the largest natural French lake (Lac du Bourget). *Harmful Algae* **4**:651–672
- Jiang L, Yang L, Xiao L, Shi X, Gao G, Qin B** (2007) Quantitative studies on phosphorus transference occurring between *Microcystis aeruginosa* and its attached bacterium (*Pseudomonas sp.*). *Hydrobiologia* **581**:161–165
- Jöhnk KD, Huisman J, Sharples J, Sommeijer B, Visser PM, Stroom JM** (2008) Summer heatwaves promote blooms of harmful cyanobacteria. *Glob Chang Biol* **14**:495–512
- Kirchman D** (2012) Microbial primary production and phototrophy. *Process Microb Ecol*:55–78.

- Kirkwood AE, Nalewajko C, Fulthorpe RR** (2006) The effects of cyanobacterial exudates on bacterial growth and biodegradation of organic contaminants. *Microb Ecol* **51**:4–12
- Klawonn I, Bonaglia S, Brüchert V, Ploug H** (2015) Aerobic and anaerobic nitrogen transformation processes in N<sub>2</sub>-fixing cyanobacterial aggregates. *ISME J* **9**:1456–1466
- Kolmonen E, Sivonen K, Rapala J, Haukka K** (2004) Diversity of cyanobacteria and heterotrophic bacteria in cyanobacterial blooms in Lake Joutikas, Finland. *Aquat Microb Ecol* **36**:201–211
- Kromkamp J** (1987) Formation and functional significance of storage products in cyanobacteria. *New Zeal J Mar Freshw Res* **21**:457–465
- Latour D, Giraudet H** (2004) Factors influencing the spatio-temporal distribution of benthic *Microcystis aeruginosa* colonies (Cyanobacteria) in the hypertrophic Grangent Reservoir (Loire, France). *C R Biol* **327**:753–761
- Leflaive J, Ten-Hage L** (2007) Algal and cyanobacterial secondary metabolites in freshwaters: A comparison of allelopathic compounds and toxins. *Freshw Biol* **52**:199–214
- Lewis WM, Wurtsbaugh WA** (2008) Control of lacustrine phytoplankton by nutrients: Erosion of the phosphorus paradigm. *Int Rev Hydrobiol* **93**:446–465
- Lewis WM, Wurtsbaugh WA, Paerl HW** (2011) Rationale for control of anthropogenic nitrogen and phosphorus in inland waters. *Environ Sci Tech* **45**:10030–10035
- Livingstone D, Jaworski GHM** (1980) The viability of akinetes of blue-green algae recovered from the sediments of Rostherne Mere. *Br Phycol J* **15**:357–364
- Marinho MM, De Oliveira E Azevedo SMF** (2007) Influence of N/P ratio on competitive abilities for nitrogen and phosphorus by *Microcystis aeruginosa* and *Aulacoseira distans*. *Aquat Ecol* **41**:525–533
- Miller TR, Beversdorf L, Chaston SD, McMahon KD** (2013) Spatiotemporal Molecular Analysis of Cyanobacteria Blooms Reveals *Microcystis* - *Aphanizomenon* Interactions. *PLoS One* **8**:e74933
- Mitchell SF** (1989) Primary production in a shallow eutrophic lake dominated alternately by phytoplankton and by submerged macrophytes. *Aquat Bot* **33**:101–110
- Mulholland MR, Bronk D, Capone DG** (2004) Dinitrogen fixation and release of ammonium and dissolved organic nitrogen by *Trichodesmium* IMS101. *Aquat Microb Ecol* **37**:85–94
- Mulholland MR, Capone DG** (2000) The nitrogen physiology of the marine N<sub>2</sub>-fixing cyanobacteria. *Trends Plant Sci* **5**:149–153
- O'Neil JM, Davis TW, Burford MA, Gobler CJ** (2012) The rise of harmful cyanobacteria blooms: The potential roles of eutrophication and climate change. *Harmful Algae* **14**:313–334
- Oberhaus L, Briand JF, Leboulanger C, Jacquet S, Humbert JF** (2007) Comparative effects of the quality and quantity of light and temperature on the growth of *Planktothrix agardhii* and *P. rubescens*. *J Phycol* **43**:1191–1199
- Paerl HW** (1978) Role of heterotrophic bacteria in promoting N<sub>2</sub> fixation by *Anabaena* in aquatic habitats. *Microb Ecol* **4**:215–231
- Paerl HW** (1996a) A comparison of cyanobacterial bloom dynamics in freshwater, estuarine and marine environments. *Phycologia* **35**:25–35.

- Paerl HW** (1996b) Microscale physiological and ecological studies of aquatic cyanobacteria: macroscale implications. *Microsc Res Tech* **33**:47–72
- Paerl HW** (2014) Mitigating Harmful Cyanobacterial Blooms in a Human- and Climatically-Impacted World. *Life* **4**:988–1012
- Paerl HW, Fulton RS** (2006) Ecology of Harmful Cyanobacteria. E Granéli and JT Turner, Eds.. Springer Berlin Heidelberg.
- Paerl HW, Fulton RS, Moisander PH, Dyble J** (2001) Harmful freshwater algal blooms, with an emphasis on cyanobacteria. *Sci World J* **1**:76–113
- Paerl HW, Hall NS, Calandrino ES** (2011) Controlling harmful cyanobacterial blooms in a world experiencing anthropogenic and climatic-induced change. *Sci Total Environ* **409**:1739–45
- Paerl HW, Otten TG** (2013) Harmful Cyanobacterial Blooms: Causes, Consequences, and Controls. *Microb Ecol* **65**:995–1010
- Paerl HW, Paul VJ** (2012) Climate change: links to global expansion of harmful cyanobacteria. *Water Res* **46**:1349–63
- Paerl HW, Pinckney JL** (1996) A mini-review of microbial consortia: Their roles in aquatic production and biogeochemical cycling. *Microb Ecol* **31**:225–247
- Paerl HW, Ustach JF** (1982) Blue-green algal scums: An explanation for their occurrence during freshwater blooms. *Limnol Oceanogr* **27**:212–217
- Paerl HW, Xu H, McCarthy MJ, Zhu G, Qin B, Li Y, Gardner WS** (2011) Controlling harmful cyanobacterial blooms in a hyper-eutrophic lake (Lake Taihu, China): the need for a dual nutrient (N & P) management strategy. *Water Res* **45**:1973–83
- Parveen B, Ravet V, Djediat C, Mary I, Quiblier C, Debroas D, Humbert JF** (2013) Bacterial communities associated with *Microcystis* colonies differ from free-living communities living in the same ecosystem. *Environ Microbiol Rep* **5**:716–724
- Peeters F, Straile D, Lorke A, Livingstone DM** (2007) Earlier onset of the spring phytoplankton bloom in lakes of the temperate zone in a warmer climate. *Glob Chang Biol* **13**:1898–1909
- Philippot L, Raaijmakers JM, Lemanceau P, van der Putten WH** (2013) Going back to the roots: the microbial ecology of the rhizosphere. *Nat Rev Microbiol* **11**:789–99
- Ploug H** (2008) Cyanobacterial surface blooms formed by *Aphanizomenon sp.* and *Nodularia spumigena* in the Baltic Sea: Small-scale fluxes, pH, and oxygen microenvironments. *Limnol Oceanogr* **53**:914–921
- Ploug H, Adam B, Musat N, Kalvelage T, Lavik G, Wolf-Gladrow D, Kuypers MMM** (2011) Carbon, nitrogen and O<sub>2</sub> fluxes associated with the cyanobacterium *Nodularia spumigena* in the Baltic Sea. *ISME J* **5**:1549–58
- Ploug H, Musat N, Adam B, Moraru CL, Lavik G, Vagner T, Bergman B, Kuypers MMM** (2010) Carbon and nitrogen fluxes associated with the cyanobacterium *Aphanizomenon sp.* in the Baltic Sea. *ISME J* **4**:1215–23
- Pope PB, Patel BKC** (2008) Metagenomic analysis of a freshwater toxic cyanobacteria bloom. *FEMS Microbiol Ecol* **64**:9–27

- Renaud F, Pringault O, Rochelle-Newall E** (2005) Effects of the colonial cyanobacterium *Trichodesmium* spp. on bacterial activity. *Aquat Microb Ecol* **41**:261–270
- Reynolds C.** (2006) The Ecology of Phytoplankton. CCU Press, Ed. 1st edn.
- Reynolds CS, Oliver RL, Walsby AE** (1987) Cyanobacterial dominance: The role of buoyancy regulation in dynamic lake environments. *New Zeal J Mar Freshw Res* **21**:379–390
- Sabart M, Misson B, Jobard M, Bronner G, Donnadieu-Bernard F, Duffaud E, Salençon MJ, Amblard C, Latour D** (2014) Genetic diversity along the life cycle of the cyanobacterium *Microcystis*: Highlight on the complexity of benthic and planktonic interactions. *Environ Microbiol* **17**:901–911
- Salomon PS, Imai I** (2006) Pathogens of harmful microalgae. *Ecol Harmful Algae* **189**:271–282
- Schagerl M, Müller B** (2006) Acclimation of chlorophyll-a and carotenoid levels to different irradiances in four freshwater cyanobacteria. *J Plant Physiol* **163**:709–716
- Schindler DW, Hecky RE, Findlay DL, Stainton MP, Parker BR, Paterson MJ, Beaty KG, Lyng M, Kasian SEM** (2008) Eutrophication of lakes cannot be controlled by reducing nitrogen input: results of a 37-year whole-ecosystem experiment. *Proc Natl Acad Sci USA* **105**:11254–11258
- Schirrmeister BE, de Vos JM, Antonelli A, Bagheri HC** (2013) Evolution of multicellularity coincided with increased diversification of cyanobacteria and the Great Oxidation Event. *Proc Natl Acad Sci USA* **110**:1791–6
- Sciuto K, Moro I** (2015) Cyanobacteria: the bright and dark sides of a charming group. *Biodivers Conserv* **24**:711–738
- Scott JT, McCarthy MJ** (2010) Nitrogen fixation may not balance the nitrogen pool in lakes over timescales relevant to eutrophication management. *Limnol Oceanogr* **55**:1265–1270
- Shen H, Niu Y, Xie P, Tao M, Yang X** (2011) Morphological and physiological changes in *Microcystis aeruginosa* as a result of interactions with heterotrophic bacteria. *Freshw Biol* **56**:1065–1080
- Sommer U** (1986) The periodicity of phytoplankton in Lake Constance (Bodensee) in comparison to other deep lakes of central Europe. *Hydrobiologia* **138**:1–7
- Tan X, Kong F, Zeng Q, Cao H, Qian S, Zhang M** (2009) Seasonal variation of *Microcystis* in Lake Taihu and its relationships with environmental factors. *J Environ Sci* **21**:892–899
- Teeling H, Fuchs BM, Becher D, Klockow C, Gardebrecht A, Bennke CM, Kassabgy M, Huang S, Mann AJ, Waldmann J, Weber M, Klindworth A, Otto A, Lange J, Bernhardt J, Reinsch C, Hecker M, Peplies J, Bockelmann FD, Callies U, Gerdts G, Wichels A, Wiltshire KH, Glöckner FO, Schweder T, Amann R** (2012) Substrate-controlled succession of marine bacterioplankton populations induced by a phytoplankton bloom. *Science* **336**:608–11
- Thiel T, Wolk CP** (1983) Metabolic activities of isolated akinetes of the cyanobacterium *Nostoc spongiaeforme*. *J Bacteriol* **156**:369–374
- Tilman D, Kilham SS, Kilham P** (1982) Phytoplankton Community Ecology: The Role of Limiting Nutrients. *Annu Rev Ecol Syst* **13**:349–372
- Tuomainen JM, Hietanen S, Kuparinen J, Martikainen PJ, Servomaa K** (2003) Baltic Sea cyanobacterial bloom contains denitrification and nitrification genes, but has negligible denitrification activity. *FEMS Microbiol Ecol* **45**:83–96

- Tuomainen J, Hietanen S, Kuparinen J, Martikainen PJ, Servomaa K** (2006) Community structure of the bacteria associated with *Nodularia* sp. (Cyanobacteria) aggregates in the Baltic Sea. *Microb Ecol* **52**:513–22
- Wallace BB, Bailey MC, Hamilton DP** (2000) Simulation of vertical position of buoyancy regulating *Microcystis aeruginosa* in a shallow eutrophic lake. *Aquat Sci* **62**:320–333
- Walsby AE** (1994) Gas vesicles. *Microbiol Rev* **58**:94–144
- Walsby AE, Hayes PK, Boje R** (1995) The gas vesicles, buoyancy and vertical distribution of cyanobacteria in the Baltic Sea. *Eur J Phycol* **30**:87–94
- Whitton BA** (2012) Ecology of Cyanobacteria II: their diversity in time and space. Springer, Dordrecht, Netherlands.
- Wilhelm SW, Farnsley SE, LeClerc GR, Layton AC, Satchwell MF, DeBruyn JM, Boyer GL, Zhu G, Paerl HW** (2011) The relationships between nutrients, cyanobacterial toxins and the microbial community in Taihu (Lake Tai), China. *Harmful Algae* **10**:207–215
- Wood NB, Haselkorn R** (1980) Control of phycobiliprotein proteolysis and heterocyst differentiation in *Anabaena*. *J Bacteriol* **141**:1375–1385
- Worm J, Søndergaard M** (1998) Dynamics of heterotrophic bacteria attached to *Microcystis* spp. (Cyanobacteria). *Aquat Microb Ecol* **14**:19–28
- Xing P, Guo L, Tian W, Wu QL** (2011) Novel Clostridium populations involved in the anaerobic degradation of *Microcystis* blooms. *ISME J* **5**:792–800
- Yamamoto Y, Nakahara H** (2009) Seasonal variations in the morphology of bloom-forming cyanobacteria in a eutrophic pond. *Limnology* **10**:185–193
- Yang Z, Kong F, Shi X, Cao H** (2006) Morphological response of *Microcystis aeruginosa* to grazing by different sorts of zooplankton. *Hydrobiologia* **563**:225–230
- Yoshida M, Yoshida T, Takashima Y, Hosoda N, Hiroishi S** (2007) Dynamics of microcystin-producing and non-microcystin-producing *Microcystis* populations is correlated with nitrate concentration in a Japanese lake. *FEMS Microbiol Lett* **266**:49–53
- Zhen Y, Kong F** (2012) Formation of large colonies: A defense mechanism of *Microcystis aeruginosa* under continuous grazing pressure by flagellate *Ochromonas* sp. *J Limnol* **71**:61–66
- Zhu L, Wu Y, Song L, Gan N** (2014) Ecological dynamics of toxic *Microcystis* spp. and microcystin-degrading bacteria in Dianchi Lake, China. *Appl Environ Microbiol* **80**:1874–1881









## **VI. Annexes**

---



## **1. Annexes 1: Pyroséquençage 454**

### **Le pyroséquençage**

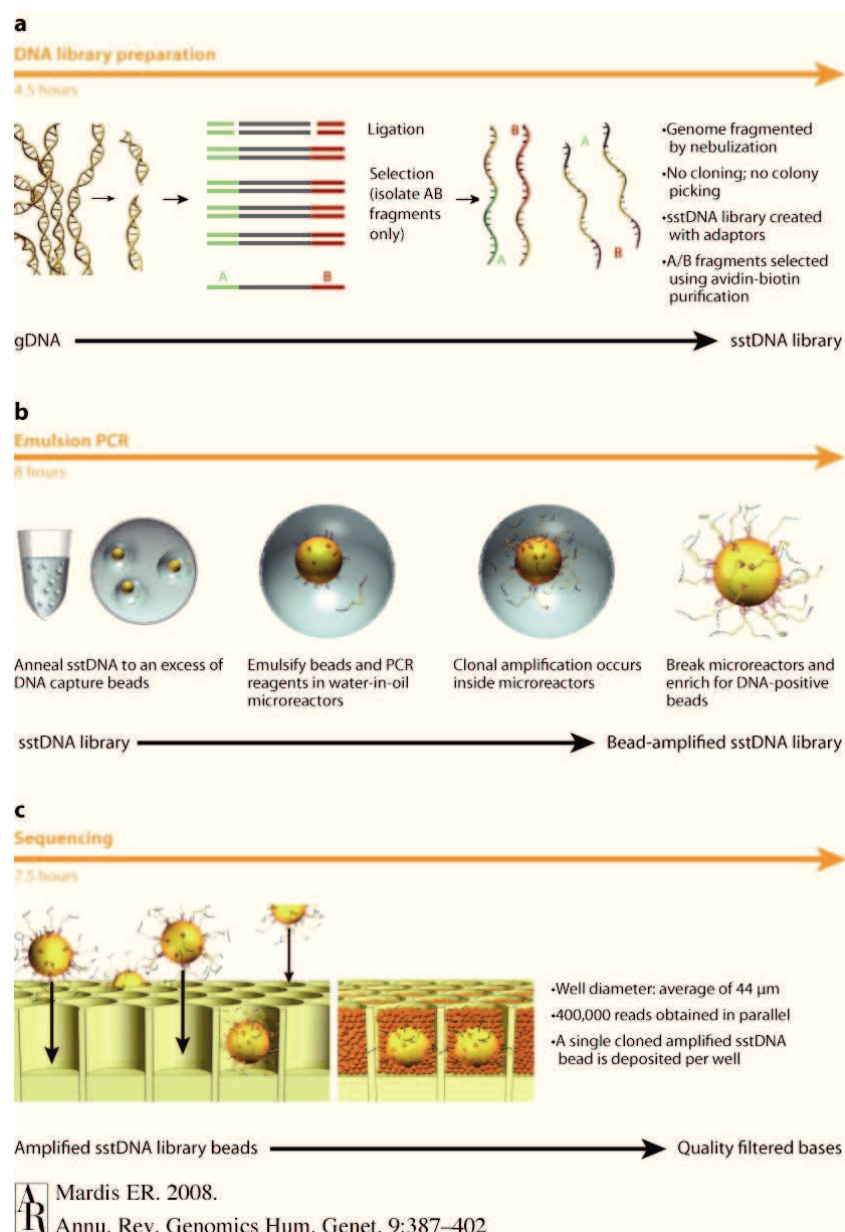
Cette technique de séquençage d'ADN a été introduite en 1988, par Hyman (Hyman 1988). Il s'agit d'un séquençage par synthèse (sequencing by synthesis, SBS) et qui se caractérise par la révélation en temps réel de l'activité de l'ADN polymérase (real time sequencing) qui ajoute un seul nucléotide non fluorescent à la fois (Ronaghi 2001).

Après préparation du mélange réactionnel, avec les enzymes clefs et les différents substrats, les nucléotides sont ajoutés un à un et non pas tous ensemble comme dans une réaction de séquençage normale. Si le nucléotide ajouté dans le milieu réactionnel correspond à celui attendu par la polymérase, il est incorporé dans le brin en cours de synthèse (d'élongation) et libère un pyrophosphate. L'ATP-sulfurylase vient alors transformer ce pyrophosphate (PPi) en ATP qui est alors utilisé, couplé à une Luciférine, par une Luciférase. On a alors production d'oxyluciférine et d'un signal lumineux. L'utilisation de l'Apyrase dégrade les nucléotides en surplus. Le signal lumineux est capté par un capteur CCD (Charge-Coupled Device) puis reproduit sous forme d'un pic sur le Pyrogramme. La hauteur de ce pic est fonction de l'intensité du signal lumineux, elle-même proportionnelle au nombre de nucléotides incorporés en même temps. On peut donc déduire la séquence à partir de la taille des pics obtenus. Par ailleurs, en cas de mélange de nucléotides à une même position (polymorphisme de séquence), la taille des pics permet d'avoir une quantification de la proportion de brins porteurs de l'un ou l'autre des nucléotides.

### **Technologie 454**

La compagnie 454 life science, spécialisée dans la fabrication de séquenceur de gènes à haut débit a développé une technologie de séquençage innovante (four five four: pour facile functional findings) (Margulies et al. 2005) qui permet de traiter avec un seul instrument, le GS20, plus de 20 millions de bases nucléotidiques par cycle de quatre heures. En effet, cette technique ne nécessite pas de clonage (donc gain de temps et d'argent), et permet une lecture directe de la séquence obtenue après le séquençage. Une seule machine (GS20) génère, avec plus de 99% d'exactitude, autant de donnée que 100 séquenceurs capillaires à haut débit. (<http://www.454.com/enablingtechnology/the-system.asp>)

Cette technologie de 454 Life Sciences est fondée sur l'intégration de plusieurs techniques : le pyroséquençage, les technologies des plaques en fibre optique picotitré (PicoTiterplate PTP) qui contient 1.6 millions de puits, la PCR en émulsion (emPCR) dans des microréacteurs (gouttelettes d'une émulsion) (300 000 réactions PCR en parallèle), ainsi que des technologies informatiques de pointe pour l'acquisition, le traitement et l'analyse des images. Les différentes étapes du processus ainsi que leur durée sont répertoriées sur la figure suivante issu de Mardis (2008).



## 2. Annexes 2: Test *in silico* des amorces NC-Pr2

Test *in silico* des amorces NC-Pr2 (895F-1492R)

### Bases utilisées :

- Base Témoin : Séquences de eubactéries sans cyanobactéries et sans séquences de plaste représentant 273489 séquences de bonne qualité (SILVA NR).
- Base cyanobactéries : Séquences de cyanobactéries et de plastes représentant 5373 séquences.

### Résumé des résultats du test :

En surligné les couples d'amorces qui sont les plus compatibles en terme de taille d'amplicon obtenu (compatible avec le pyroséquençage 454)

Position F	Position R	Nr de séquences retrouvées dans la Base Témoin	Nr de séquences retrouvées dans la Base cyanobactéries
<b>Amplification Générale</b>			
27	1492	40318	978
533	1492	76516	-
563	907	236300	4911
<b>Amplification Spécifique</b>			
27	902	9099	1
27	904	9068	1
533	902	35449	2
563	902	35615	3
533	904	35333	2
895	1492	52176	58
904	1492	11989	0
27	895	37142	45
895	1099	143697	194
895	1392	104138	149
895	1197	131108	167

### 3. Annexes 3: Biolog Ecoplate

**Tableau des familles des sources de carbone de Biolog Ecoplate™**

Well .	ID	C-source	Guild
A1	C0	Water (blank)	
B1	C1	Pyruvic acid methyl ester	Carbohydrates
C1	C2	Tween 40	Polymers
D1	C3	Tween 80	Polymers
E1	C4	Alpha-cyclodextrin	Polymers
F1	C5	Glycogen	Polymers
G1	C6	D-cellobiose	Carbohydrates
H1	C7	Alpha-D-lactose	Carbohydrates
A2	C8	Beta-methyl-D-glucoside	Carbohydrates
B2	C9	D-xylose	Carbohydrates
C2	C10	i-erythritol	Carbohydrates
D2	C11	D-mannitol	Carbohydrates
E2	C12	N-acetyl-D-glucosamine	Carbohydrates
F2	C13	D-glucosaminic acid	Carboxylic & acetic acids
G2	C14	Glucose-1-phosphate	Carbohydrates
H2	C15	D,L-alpha-glycerol phosphate	Carbohydrates
A3	C16	D-galactonic acid-gamma-lactone	Carboxylic & acetic acids
B3	C17	D-galacturonic acid	Carboxylic & acetic acids
C3	C18	2-Hydroxy benzoic acid	Carboxylic & acetic acids
D3	C19	4-Hydroxy benzoic acid	Carboxylic & acetic acids
E3	C20	Gamma-hydroxybutyric acid	Carboxylic & acetic acids
F3	C21	Itaconic acid	Carboxylic & acetic acids
G3	C22	Alpha-ketobutyric acid	Carboxylic & acetic acids
H3	C23	D-malic acid	Carboxylic & acetic acids
A4	C24	L-arginine	Amino acids
B4	C25	L-asparagine	Amino acids
C4	C26	L-phenylalanine	Amino acids
D4	C27	L-serine	Amino acids
E4	C28	L-threonine	Amino acids
F4	C29	Glycyl-L-glutamic acid	Amino acids
G4	C30	Phenylethylamine	Amines/amides
H4	C31	Putrescine	Amines/amides

Plaque commercialisé par Biolog Ecoplate™

A1 Water	A2 β-Methyl-D- Glucoside	A3 D-Galactonic Acid γ-Lactone	A4 L-Arginine	A1 Water	A2 β-Methyl-D- Glucoside	A3 D-Galactonic Acid γ-Lactone	A4 L-Arginine	A1 Water	A2 β-Methyl-D- Glucoside	A3 D-Galactonic Acid γ-Lactone	A4 L-Arginine
B1 Pyruvic Acid Methyl Ester	B2 D-Xylose	B3 D- Galacturonic Acid	B4 L-Asparagine	B1 Pyruvic Acid Methyl Ester	B2 D-Xylose	B3 D- Galacturonic Acid	B4 L-Asparagine	B1 Pyruvic Acid Methyl Ester	B2 D-Xylose	B3 D- Galacturonic Acid	B4 L-Asparagine
C1 Tween 40	C2 i-Erythritol	C3 2-Hydroxy Benzoic Acid	C4 L- Phenylalanine	C1 Tween 40	C2 i-Erythritol	C3 2-Hydroxy Benzoic Acid	C4 L- Phenylalanine	C1 Tween 40	C2 i-Erythritol	C3 2-Hydroxy Benzoic Acid	C4 L- Phenylalanine
D1 Tween 80	D2 D-Mannitol	D3 4-Hydroxy Benzoic Acid	D4 L-Serine	D1 Tween 80	D2 D-Mannitol	D3 4-Hydroxy Benzoic Acid	D4 L-Serine	D1 Tween 80	D2 D-Mannitol	D3 4-Hydroxy Benzoic Acid	D4 L-Serine
E1 α- Cyclodextrin	E2 N-Acetyl-D- Glucosamine	E3 γ- Hydroxybutyric Acid	E4 L-Threonine	E1 α- Cyclodextrin	E2 N-Acetyl-D- Glucosamine	E3 γ- Hydroxybutyric Acid	E4 L-Threonine	E1 α- Cyclodextrin	E2 N-Acetyl-D- Glucosamine	E3 γ- Hydroxybutyric Acid	E4 L-Threonine
F1 Glycogen	F2 D- Glucosaminic Acid	F3 Itaconic Acid	F4 Glycyl-L- Glutamic Acid	F1 Glycogen	F2 D- Glucosaminic Acid	F3 Itaconic Acid	F4 Glycyl-L- Glutamic Acid	F1 Glycogen	F2 D- Glucosaminic Acid	F3 Itaconic Acid	F4 Glycyl-L- Glutamic Acid
G1 D-Cellobiose	G2 Glucose-1- Phosphate	G3 α-Ketobutyric Acid	G4 Phenylethyl- amine	G1 D-Cellobiose	G2 Glucose-1- Phosphate	G3 α-Ketobutyric Acid	G4 Phenylethyl- amine	G1 D-Cellobiose	G2 Glucose-1- Phosphate	G3 α-Ketobutyric Acid	G4 Phenylethyl- amine
H1 α-D-Lactose	H2 D,L-α- Glycerol Phosphate	H3 D-Malic Acid	H4 Putrescine	H1 α-D-Lactose	H2 D,L-α- Glycerol Phosphate	H3 D-Malic Acid	H4 Putrescine	H1 α-D-Lactose	H2 D,L-α- Glycerol Phosphate	H3 D-Malic Acid	H4 Putrescine



**4. Annexes 4: Tableau II. S3**  
**Tableau S3 de l'Article 1 (Section II.2)**

Taxonomy	% of reads ABA	% of reads ABF	% of reads MBA	% of reads MBF	# seq ≥98% id	geographic origin	Originated ecosystem and function if it's identified	Associated or not to cyanobacterial bloom	Cyanobacteria associated	Accession number
Proteobacteria; Gammaproteobacteria; Enterobacteriales; Enterobacteriaceae	1.05	0.09	0.01	0	> 100	China, India	Bacterial associated with fruit fly (2), rhizosphere (4), human feces (1), human skin (+20),	not in the tested sequences	-	KM974659.1; AB920802.1; Q918061.1; JQ918057.1; KJ997976.1; KJ921705.1; KF516237.1; KJ803870.1; KJ718990.1; KJ718988.1; KJ718984.1; KF107414.1; KF107229.1; KF107143.1; KF107136.1; KF107135.1; KF107085.1; KF107080.1; KF107069.1
Proteobacteria; Gammaproteobacteria; Xanthomonadales; uncultured	2.27	0.15	0.07	0	32	China, USA, Sweden	Lake Taihu (2), seawater (1), integrated lake epilimnion from pooled DNA from lake samples (3), Dongping lake (2), freshwater bacterioplankton during bloom (1), cyanobacterial bloom in freshwater pond (1), Tingxi freshwater reservoir (2), lake Gatun (2), Bantou freshwater reservoir (2), Lake Charles, Street and Industrial Canal (10)	yes	<i>Microcystis aeruginosa</i>	JX406219.1; JN119212.1; HQ530659.1; FJ612377.1; AY509440.2; KC253327.1; JN869093.1; HQ661344.1; HQ661343.1; HQ530695.1; HQ530658.1; EU803605.1; EU803473.1; HQ661191.1; HQ661190.1; FJ354677.1; FJ353730.1; FJ349758.1; FJ349843.1; FJ350919.1
Proteobacteria; Betaproteobacteria; Burkholderiales; Comamonadaceae; uncultured	9.96	1.36	0.14	0.11	> 100	Germany, China, France, USA,	floodplain (1), Huangpu River (2), sludge in anoxic tank of hybrid reactor (1), activated sludge (6), municipal wastewater treatment plant (2), Biofilm (2), Wakulla Spring (1), root-associated bacteria in artificial wetlands (1), Hidou freshwater reservoir (1), freshwater calcareous mat (1), partial nitrifying-ANAMMOX municipal wastewater reactor (1), Anaerobic bioreduction of nitrate in hydroge-based membrane biofilm reactor (1)	not in the tested sequences	-	FM886840.1; JQ814744.1; JN391901.1; JN391885.1; F808871.1; HQ609628.1; EU283352.1; EF572731.1; CU466923.1; KJ013970.1; KF428047.1; KF836203.1; JX432005.1; JX431991.1; KC189638.1; JN204151.1; HQ661280.1; FJ484843.1; EF580972.1; HQ640616.1

Proteobacteria; Betaproteobacteria; Burkholderiales; Comamonadaceae	5.79	8.63	0.03	1.23	> 100	Netherlands, China, Japan, Germany, India, Singapore, France	Soil from Tet watersheds (2), lake Taihu (1), stream of Dianchi Lake (2), octylphenol polyethoxylate-degrading bacteria in river sediments (3), Dongping lake (2), river Leine sediment (1), iron-oxidation biofilm (2), freshwater biofilm (1), drinking water distribution system (1), low temperature hydrothermal oxides (1), early biofilms on different surfaces in urban freshwater (1), particle-associated betaproteobacteria in Lac du Bourget (1), Kelike Lake (1), low-grade copper bioleaching heap (1)	not in the tested sequences	-	JQ696279.1; JN869110.1; JF697516.1; AB374782.1; FJ612216.1; EU244077.1; AB252905.1; AB252904.1; KP071358.1; KF827196.1; JQ923990.1; JQ696326.1; JN860412.1; HQ860520.1; JF277873.1; HQ453932.1; AB374694.1; AB374686.1; HM129198.1; GU208313.1
Proteobacteria; Betaproteobacteria	0.06	0.82	34.21	6.40	5	China, USA	Lake Nanhu (1), lake Inbanuma (1), lake Mendota (1), 55-day-old anaerobic fermentation course of Microcystis blooms (1), enrichment sample(1)	yes	<i>Microcystis</i>	JN941777.1; AB599922.1; FJ827947.1; GU559809.1; JQ958636.1
Proteobacteria; Alphaproteobacteria; SAR11 clade	0.01	0.03	0.10	1.36	> 100	USA, Chine, France, Germany, Japan, Canada	Mississippi River Basin (2), lake Niushan (1), Westensee lake water (1), deep mine drilling fluid (1), Lake Taihu (1), Miyu reservoir water (1), drinking water and granular activated carbon water (1), Green Lake (1), Lake Gatun (1), Delaware Bay (6), Chesapeake Bay (1), brackish samples from Weser estuary (1), Lake Kasumigaura (1), Pavin Lake (1), Coldspring Lake (1)	not in the tested sequences	-	KJ914640.1; JN941900.1; JX220031.1; JX448575.1; JN869020.1; GU305707.1; GQ453071.1; FJ916098.1; EU803454.1; EU801183.1; EU801142.1; EU800471.1; EU800443.1; EU800319.1; EU800141.1; EU800116.1; AY145598.1; AB154321.1; AY752103.1; KP687181.1
Proteobacteria; Gammaproteobacteria; Enterobacteriales; Enterobacteriaceae	4.82	0.33	0.06	0.23	> 100	Portugal, China, India, Spain	Hospital effluents discharged in urban wastewater (1), sewage sludge domesticated by anaerobic-aerobic sequencing batch reactor (1), activated sludge in aerobic tank of urban sewage treatment plant (2), pathogens and normal flora of eel (6), digestive tract of freshwater fish (1), fermentation of idle batter (2), feces of <i>Euchoreutes naso</i> (1), human faeces (1), Jiulong River (1), water from Pichhola lake (1), gut microbiota from Scarab Larvae (2), pathogens from ornamental fish (1)	not in the tested sequences	-	LN624802.2; KM515974.1; KM391948.1; KM289145.1; KM289143.1; KM269016.1; KM269015.1; KM269014.1; KM269006.1; KM268972.1; KM268971.1; KM268970.1; KM222627.1; KJ830715.1; KJ830707.1; CP008841.1; KC812821.1; KJ660110.1; HG974539.1; KJ806341.1

Proteobacteria; Betaproteobacteria; Burkholderiales; Comamonadaceae; Leptothrix	3.92	0.15	0	0.02	> 100	USA, Denmark, China, Germany, Peru, New Zealand, Japan	Plant leaves in a freshwater (1), arsenite-oxidizing biofilm (1), active denitrifiers in activated sludge (3), Biofilm in a biofilter during phosphorus periodical bioaccumulation and harvesting processes (4), rhizosphere (1), embryonic stage of <i>Hydra vulgaris</i> (1), arctic stream sediment (1), Dongping lake sediment (3), periglacial soil (1), freshwater biofilm (1), activated sludge (2), Active denitrifiers in rice paddy soil (1)	not in the tested sequences	-	HM535419.1; AY168745.2; KF533783.1; JX431974.1; JN038694.1; HQ111167.1; FJ849351.1; GU208356.1; GU208297.1; GQ306142.1; FJ662745.1; KF533843.1; KF533789.1; JX431988.1; JX431971.1; JX431947.1; KC551610.1; KC551585.1; AB672130.1; HQ738453.1
Proteobacteria; Betaproteobacteria; Burkholderiales; Comamonadaceae; Polaromonas	0.13	0.73	2.42	2.21	> 100	China, Argentina, Antarctica, USA, Singapore, Spain, Indonesia	Lake Nanhu (1), Dongping lake (1), freshwater reservoir (1), lake Teganuma (1), Lundstrom lake (1), Lake Bosten (1), Biofilm-Electrode with Sulfur Autotrophic denitrification (1), <i>Paeonia ostii</i> rhizosphere soil (1), periphyton (1), activated sludge (2), ANAMMOX reactor (1), creosote polluted soil (1), sunflower rhizosphere (1), marine hot spring (1), industrial circulating cooling water system (1), activated sludge reactor (1), enrichment culture of grass carp intestine contents (1), primary drinking water supply (5), Yellowstone lake (1)	not in the tested sequences	-	JN941783.1; FJ612362.1; HQ008598.1; AB607278.1; FR691427.1; HQ436734.1; KP717532.1; KP663402.1; KM408583.1; KF712703.1; KF836351.1; JX257277.1; KC252871.1; AB516227.1; JX875876.1; JQ771995.1; JX047143.1; JQ323104.1; JN391672.1; JF830225.1

Proteobacteria; Betaproteobacteria; Burkholderiales; Comamonadaceae	2.57	4.94	0	0.01	> 100	China, Spain, United Kingdom, USA, Netherlands, Portugal, Iran	Shimen Realgar Mine (1), rhizoplane <i>Leontopodium alpinum</i> (1), floodplain soil (1), Zoige Alpine wetland (1), aerobic benzene-degrading consortium from benzene-contaminated groundwater from a sandstone aquifer (1), subsurface groundwater during polylactate stimulated chromate bioremediation (1), water treatment filters (1), uranium contaminated water and sediments (1), temperate grassland/deciduous forest (1), mine drainage water (2), sediment and groundwater with acetate amendment (6), subsurface aquifer sediment (1), water samples obtained from a micro saltwater lake (1), activated sludge from a membrane bioreactor (1)	not in the tested sequences	-	AB795550.1; AB681449.1; KC961265.1; JQ977158.1; JQ976511.1; JX222966.1; JX222618.1; HM151666.1; FJ801209.1; AM110076.2; DQ264511.1; EU130955.1; KF441648.1; KJ489982.1; KF975530.1; KF975527.1; JX225402.1; JX223352.1; JX222209.1; JX221781.1
Proteobacteria; Alphaproteobacteria; Rhodospirillales; Acetobacteraceae; Rubritipida	0	0.06	1.92	1.33	> 100	China, Panama, Greece, Germany,	55 and 60-day-old anaerobic fermentation course of <i>Microcystis</i> blooms (5), Dongping lake (1), lake Gatun (1), freshwater ponds (1), lake Nanhu (2), Dianchi lake (1), enrichment culture of grass carp intestine contents (1), Marathonas reservoir (2), freshwater bacterioplankton during cyanobacterial bloom (1), decaying chloramine residuals in a lab-scale system (4), lake Walchen (1)	yes	<i>Microcystis</i> , <i>Aphanizomenon</i> , <i>Anabaena</i>	GU559835.1; FJ612228.1; EU803336.1; KC253364.1; JN941771.1; JN941770.1; HQ860513.1; JF830219.1; GU559849.1; GQ340312.1; AY509418.1; GQ340244.1; JQ629566.1; JQ629528.1; JQ629493.1; GU559800.1; GU559787.1; JF275008.1; JF830233.1; HQ532043.1
Proteobacteria; Betaproteobacteria; Burkholderiales; Comamonadaceae	0.92	1.79	0.02	0.10	> 100	Canada, Switzerland, Czech Republic, Spain, China, Sweden, Finland, USA, Austria	Lake Ontario (1), epibionts of <i>Daphnia</i> sp. in lake Zurich (19), reservoir for drinking water supply (4), lake BassaOles (4), stream of Dianchi lake (5), Nam Co lake (3), Tanggula lake (4), groundwater (1), lake Xinxinhai (1), groundwater from intermediate depth borehole (1), Chesapeake Bay (4), Lake Mondsee (1)	not in the tested sequences	-	KM031320.1; HF968602.1; HF968597.1; HF968596.1; HF968594.1; HF968591.1; HF968588.1; HF968586.1; HF968576.1; HF968572.1; HF968570.1; HF968569.1; HF968567.1; HF968565.1; HF968562.1; HF968559.1; HF968557.1; HF968552.1; HF968551.1; HF968550.1

Verrucomicrobia; Spartobacteria; Chthoniobacteriales; FukuN18 freshwater group	0.89	2.43	0	0	15	USA, China, France, Japan	integrated lake epilimnion from pooled DNA from lake samples (6), lake Taihu (1), Pavin lake (2), lake Poyang (1), Bourget lake (2), Nam Co lake (1), Kelike Lake (1), methane oxidizing DHS reactor (2)	not in the tested sequences	-	HQ532160.1; HQ532044.1; HQ532023.1; HQ532021.1; HQ531561.1; HQ531550.1; AM690926.1; AY752089.1; AY752101.1; AF428656.1; JQ942016.1; HM129944.1; HM129219.1; AB504636.1; JQ942104.1
Proteobacteria; Betaproteobacteria; Burkholderiales; Alcaligenaceae; MWH-UniP1 aquatic group	2.02	2.35	0.01	0	27	China, USA, Switzerland, Tanzania, Sweden, Panama, Greece, Germany, France	Sediments of lakes in Daqing (1), integrated lake epilimnion from pooled DNA from lake samples of Green Lake & Rock Lake (1), Bloom of <i>Planktothrix rubescens</i> in lake Zurich (1), Dongping lake (4), freshwater pond Dar es Salaam (2), lake Erken during cyanobacteria bloom (1), surface water of lake Niushan (1), carpet-like mucilaginous cyanobacterial blooms in a hypereutrophic lake (2), Shidou freshwater reservoir (2), Hubian freshwater reservoir (1), lake Gatun (2), Marathonas Reservoir (1), lake water (1), methanotrophic bacteria in Terrebbonne Bay (1), source of drinking water (1), lake Poyang (1), <i>Microcystis</i> bloom in eutrophic bay (1), Changjiang river (1), composting of cow manure (1), drinking water treatment plant (1)	yes	<i>Planktothrix rubescens</i> , <i>Gloeotrichia echinulata</i> , <i>Microcystis</i>	KJ176840.1; HQ531231.1; FN668032.2; FJ612366.1; FJ612277.1; AJ565421.1; AY509453.2; JN941940.1; JF830210.1; HQ828025.1; HQ827932.1; HQ661266.1; HQ661227.1; EU803737.1; EU803579.1; EU037357.2; AJ565422.1; HQ661284.1; FJ612399.1; GQ340356.1
Proteobacteria; Betaproteobacteria	0.01	0.07	4.05	0.66	5	China, USA	Lake Nanhu (1), lake Inbanuma (1), lake Mendota (1), 55-day-old anaerobic fermentation course of <i>Microcystis</i> blooms (1), mucilaginous Cyanobacterial Aggregates (1)	yes	<i>Microcystis</i>	JN941777.1; AB599922.1; FJ827947.1; GU559809.1; JQ958636.1

Proteobacteria; Alphaproteobact eria; Caulobacterales; Caulobacteracea e; Phenylobacteriu m	2.14	2.49	2.26	0.94	> 100	China, Greece, USA, Canada, Finland, Korea, Spain, New Zealand, Germany, Australia	Lake Kasumigaura (2), 60-day-old anaerobic fermentation course of <i>Microcystis</i> blooms (3), lake Kastoria (1), trichloroethylene-contaminated groundwater (1), anaerobic degradation of <i>Microcystis</i> blooms and surface sediment mixture (1), lake Xinxinhai (2), hypolimnion (hypoxic bottom) water from permafrost thaw pond (1), bacteria associated with <i>Oxyria digyna</i> (1), rhizosphere soil of eggplant (1), aquifer sediments (2), water of lotus flower pond (1), rhizosphere of maize and the surrounding carbonate-rich bulk soil (1), activated sludge (2), lake Grosse Fuchskuhle (1), bacteria in permafrost wetland (1), decaying chloramine residuals in a lab-scale system (1)	yes	<i>Microcystis aeruginosa</i>	AB607297.1; GU559794.1; AF236003.1; AB607296.1; GU559797.1; GU559783.1; EF203203.1; AY706417.1; HQ904139.1; EU703406.1; JX221918.1; JN656835.1; EU703427.1; JX223018.1; HE814774.2; JF776893.1; FJ719086.1; FJ719043.1; KM035963.1; JN367066.1
Proteobacteria; Alphaproteobact eria; Rhodospirillales	0.80	1.72	0	0	4 (95%)	Germany	Oxic zone of 70-day-old flooded (unplanted) rice paddy soil microcosm (2), <i>Hydra vulgaris</i> (1), <i>Paulinella chromatophora</i> culture	not in the tested sequences	-	AM411930.1; AM411929.1; HQ111162.1; DQ789040.1
Proteobacteria; Betaproteobacte ria; Burkholderiales; Oxalobacteracea e; Massilia	4.64	3.11	0	0.01	> 100	China, Italy, Germany, USA, Korea	Biofilm in freshwater (2), wastewater treatment plant (1), magnetite drainage sample (1), 1,2-dichloroethane contaminated aquifer (1), Xiao river (1), Arsenite oxidizing bacteria isolated from a goldmine (1), Chlorobenzene degrading bacteria isolated from a chlorobenzene-contaminated aquifer system (1), atrazine-mineralizing bacteria in wetland sediment (2), arsenic contaminated groundwater (2), petrochemical wastewater treatment plant sludge (3), consortia of <i>Scenedemus obliquus</i> bacteria (2), health food drink (1), water of Giheung lake (1), solid-phase denitrification biofilm (1)	not in the tested sequences	-	KF827351.1; KF827067.1; JQ624270.1; HQ652596.1; FM204986.1; FJ230925.1; EU521706.1; AF235013.1; KP641171.1; LC015536.1; KP115663.1; KP115646.1; KF841311.1; KF841203.1; KJ782808.1; KJ782717.1; KJ782683.1; KJ632069.1; KJ660098.1; KF999729.1

Proteobacteria; Alphaproteobact eria; Rhodospirillales	6.80	19.32	0	0.02	3 (96%)	Germany, USA	Oxic zone of 70-day-old flooded (unplanted) rice paddy soil microcosm (2), <i>Paulinella chromatophora</i> culture (1)	not in the tested sequences	-	AM411930.1; AM411929.1; DQ789040.1
Proteobacteria; Betaproteobacte ria; Burkholderiales; Burkholderiace e	0.01	0.04	0.42	2.71	> 100	France (1), China, USA, Japan, Argentina	Rock pool filed with freshwater (1), freshwater ponds during cyanobacterial bloom (1), surface water of lake Nanh u (2), industrial circulating cooling wa ter system (1), Lake Taihu (2), enri chment culture of grass carp intestine contents (1), stream of Dianchi lake (1), Shidou freshwater reservoir (1), Yellowstone lake (2), surface of brack ishwater, lake Hinuma (7), freshwater reservoir (1)	yes	not mentioned	NR_125545.1; KC253312.1; JN941782.1; JN941781.1; JQ323106.1; JN869087.1; JN869082.1; JF830207.1; JF697477.1; HQ661278.1; HM856538.1; HM856445.1; AB599874.1; AB599873.1; AB599872.1; AB599871.1; AB599870.1; AB599869.1; AB599868.1; HQ008538.1
Proteobacteria; Betaproteobacte ria; Burkholderiales; Burkholderiace e; Burkholderia	0	0.03	1.81	0.33	5 (95%)	China, USA	Lake Nanh u (1), lake Inbanuma (1), lake Men dota (1), 55-day-old anaerobic fer mentation course of <i>Microcystis</i> blooms (1), mucilaginous Cyanobac terial Aggregates (1)	yes	<i>Microcystis</i>	JN941777.1; AB599922.1; FJ827947.1; GU559809.1; JQ958636.1
Proteobacteria; Alphaproteobact eria; Rhodobacterales ; Rhodobacterace ae; Rhodobacter	0.01	0.03	1.33	0.51	1	China	Day 0 sample during anaerobic degradation of <i>Microcystis</i> blooms and surface sediment mixture	yes	<i>Microcystis</i>	HQ904129.1



Proteobacteria; Betaproteobacteria; Burkholderiales; Comamonadaceae; uncultured	6.52	0.53	0.02	0.04	> 100	Argentina, USA, Switzerland, China, Germany, France, Japan	Sphagnum moss from peat bog (1), arctic thermal spring (1), Chaerhan lake (1), sulfur containing freshwater source (2), activated sludge from membrane bioreactor (1), floodplain (1), Huangpu river (2), polycyclic aromatic hydrocarbons degrading bacterial community in retention systems which treat road runoffs (1), sludge in anoxic tank of hybrid reactor (2), activated sludge in a membrane bioreactor (2), sludge samples collected from biofilm or activated sludge (1), activated sludge (1), activated sludge of anaerobic/anoxic/aerobic process treating domestic wastewater (2), methane oxidizing DHS reactor (1), lake water isolated from algal microcosm (1)	not in the tested sequences	-	JF907240.1; JX257778.1; HM126838.1; AB476711.1; AB476707.1; EU283352.1; FM886840.1; KP280916.1; KP280898.1; AB980166.1; JQ814744.1; FQ658719.1; JN391901.1; JN391885.1; JF808871.1; HQ609628.1; HQ592570.1; AB543730.1; AB543729.1; AB504659.1
Proteobacteria; Betaproteobacteria; Burkholderiales; Comamonadaceae; Variovorax	0.42	1.01	0.03	2.08	> 100	China, Brazil, Thailand, Spain, Italy, USA, South Korea, Japan, Canada, Puerto Rico	Host of <i>Sogatella furcifera</i> (1), Endophytic bacteria in sugarcane wild germplasms (4), Endophytic bacteria and rhizosphere bacteria with cadmium-tolerance (1), Soil (1), biological soil crust of copper mine (2), citronella grass rhizosphere (1), acidophilic sulfate-reducing bacteria from Tinto River sediments (1), Variovorax bioemulsifiers producer (1), recirculating membrane reactor (1), contaminated soil (1), rhizosphere and bulk soil rich in potassium (1), poly(butylene sebacate)-degrading bacteria (1), bacteria growing at the expense of arbuscular mycorrhizal fungi (1), Bacterial Associations with weathered minerals (1), bacteria with carbonatogenic activity in consolidating treatment of deteriorated stone (1), parathion-degrading bacteria isolated from rice paddy soils (1)	not in the tested sequences	-	KP116945.1; KF557618.1; KJ200411.1; KJ185040.1; KJ185023.1; KJ184862.1; KF051781.1; JX575029.1; JQ770029.1; JQ769513.1; JN016600.1; JQ420060.1; JN627864.1; JN618391.1; JN561302.1; JF772527.1; AB627013.1; JF495126.1; FN668006.1; HQ445655.1

Proteobacteria; Betaproteobacteria; Burkholderiales; Burkholderiaceae	0	0.06	0.43	3.35	> 100	Austria, Switzerland, China, Japan, USA	Lake Mondsee (1), <i>Daphnia galeata</i> culture water (7), diseased leaf in lake Taihu (1), lake Taihu (1), lake Teganuma (1), lake Inbanuma (8), Dongjiang river (1), lake Kasumigaura (2), integrated lake epilimnion from pooled DNA from lake samples (1), lake Biwa (17)	not in the tested sequences	-	NR_125487.1; HF968620.1; HF968619.1; HF968617.1; HF968614.1; HF968612.1; HF968607.1; HF968606.1; JQ941855.1; JN868984.1; AB626845.1; AB626829.1; AB626824.1; AB626820.1; AB626819.1; AB626817.1; AB626816.1; AB626814.1; JF429291.1
Proteobacteria; Betaproteobacteria; Burkholderiales; Comamonadaceae	1.42	0.01	0	0	39	USA (1), China (1), Germany (1), China (1), Germany (1), China (1), Japan, New Zealand, Chile, Antarctica (1),	Arctic thermal spring (1), Chaerhan Lake (1), sulfur containing freshwater source (4), activated sludge (3), floodplain (1), Huangpu River (2), sludge in anoxic tank of hybrid reactor (2), activated sludge in a membrane bioreactor (2), sludge samples collected from biofilm or activated sludge (1), methane oxidizing DHS reactor (1), Lake Vida ice cover (2), batch anaerobic bioreduction of nitrate and sulfate in contaminated groundwater (1)	not in the tested sequences	-	JX257778.1; HM126838.1; AB476707.1; EU283352.1; FM886840.1; AB476711.1; KP280916.1; KP280898.1; JQ814744.1; JN391901.1; JN391885.1; JF808871.1; HQ609628.1; HQ592570.1; AB504659.1; EU104336.1; EU104142.1; EU104130.1; EF632937.1; EF572731.1
Proteobacteria; Alphaproteobacteria; Rhodobacterales; Rhodobacteraceae	0.42	2.63	0.01	0.14	> 100	China (3), Netherlands (2), China (2), China (3), China (1), USA (2), China (1), USA (1), USA (1), China (1), China (1), Sweden (1), China (1)	Lake Taihu (3), water Column Lake Vinkeveense Plaasen (2), Kelike Lake (2), Wuliangshuai Lake (3), Lake Zhaling (1), Chesapeake Bay (2), constructed wetland (1), Columbia River estuary (1), Delaware Bay (1), intestinal microflora in Chinese mitten crab ( <i>Eriocheir sinensis</i> ) (1), Lake Dongting (1), associated with cyanobacterial bloom (1), Dianchi Lake (1)	yes	<i>Aphanizomenon</i> , <i>Anabaena</i>	HQ904237.1; HQ904233.1; GU559760.1; JN869047.1; HQ904129.1; GU559790.1; AB515715.1; GU559808.1; FJ662739.1; EF095021.1; AF234745.1; HM128933.1; AY145582.1; DQ376570.1; KF427967.1; KC683251.1; KC683235.1; AB516210.1; HM773467.1; GU455339.1

Proteobacteria; Alphaproteobact eria; Rhodobacterales ; Rhodobacterace ae; Rhodobacter	0.03	0.03	3.71	1.66	> 100	China, New Zealand, Germany,	Day 0, 55 and 60 sample during anaerobic degradation of Microcystis blooms and surface sediment mixture (4), 12, 55and 60-day-old anaerobic fermentation course of Microcystis blooms (3), Lake Taihu (1), polyhydroxyalkanoates accumulating organisms in activated sludge (2), freshwater biofilm (1), activated sludge from wastewater treatment plant (1), nitrifying-denitrifying activated sludge (1), Kelike Lake (1), brackish samples from Weser estuary (1), aerobic sequencing batch reactor (1), periphyton (2), biofilm- consortium (1), anaerobic fermentation reactor with waste activated sludge at thermophilic (1)	yes	<i>Microcystis</i>	HQ904237.1; HQ904233.1; GU559760.1; JN869047.1; HQ904129.1; GU559790.1; AB515715.1; GU559808.1; FJ662739.1; EF095021.1; AF234745.1; HM128933.1; AY145582.1; DQ376570.1; KF427967.1; KC683251.1; KC683235.1; AB516210.1; HM773467.1; GU455339.1
Proteobacteria; Betaproteobacte ria; Burkholderiales; Comamonadace ae; Variovorax	0.30	4.29	0.04	3.43	> 100	Canada, Switzerland, Spain, Netherlands, China, Czech Republic	Neuston biofilm in Lake Ontario and lake Ontario (2), epibionts of Daphnia in lake Zurich (3), Lake Filia (2), water column of lake Vinkeveense Plaasen (2), Dianchi lake (4), bacetria in <i>Daphia magna</i> (1), lake Taihu (1), small deep pond (1), deep submontane lake in prealpine region (1), shallow fishpond (1), reservoir for drinking water supply (2)	not in the tested sequences	-	KP686749.1; KM105812.1; KM031328.1; KM031321.1; HF968603.1; HF968534.1; HF968511.1; HE857133.1; HE857081.1; HE655010.1; HE654968.1; HQ860537.1; JN392905.1; N868865.1; HE600689.1; HE600680.1; HE600678.1; HE600672.1; HE600668.1; HE600665.1
Proteobacteria; Betaproteobacte ria; Burkholderiales; Comamonadace ae; Polaromonas	0.03	0.05	0.31	3.56	> 100	China (1), Czech republic (1), Japan, France, Austria	Streams of Dianchi lake (2), lake Taihu (1), reservoir for drinking water supply (1), lake Bosten (11), lake Ushikunuma (1), lake Inawashiro (1), particule associated <i>betaproteobacteria</i> in Bourget lac (1), Kelike lake (1), Chesapeake Bay (7), Delaware Bay (11), lake Inbanuma (1), Parker river (2), Ipswich river (1), lake Mondsee (3)	not in the tested sequences	-	KP687232.1; KP687208.1; KP687069.1; KP687065.1; KP686908.1; KP686891.1; KP686837.1; KP686827.1; KP686823.1; KP686822.1; KP686814.1; KP686804.1; KP686734.1; KP686636.1; KP686632.1; KP686589.1; HQ860581.1; JN868897.1; HE600685.1; JF429304.1

Proteobacteria; Betaproteobacteria; Burkholderiales; Comamonadaceae; BAL58 marine group	0	0.04	0.42	1.25	> 100	France (1), Switzerland (1), Canada, China, Japan, Spain, USA	Bourget lac (5), lake Zurich (83), lake Ontario (1), methane-oxidizing bacteria in a subtropical reservoir (1), lake Mizugaki (1), lake Llauset (1), lake Taihu (1), Dongjiang river (6), carpet-like mucilaginous cyanobacterial blooms in a hypereutrophic lake (2), integrated lake epilimnion from pooled DNA from lake samples (1), Yellowstone lake (4)	yes	<i>Microcystis</i>	HQ453834.1; LN681434.1; KP687211.1; KP687122.1; KP686789.1; KP686775.1; LN827929.1; LN681518.1; LN681514.1; LN681510.1; LN681502.1; LN681494.1; LN681490.1; LN681482.1; LN681478.1; LN681474.1; LN681470.1; LN681466.1; LN681462.1; LN681450.1
Proteobacteria; Alphaproteobacteria; Rhodospirillales; Acetobacteraceae; Roseomonas	0	0	1.12	0.64	1	china	Kelike lake	not in the tested sequences		HM128975.1
Proteobacteria; Alphaproteobacteria; Rhodospirillales; Acetobacteraceae; Roseomonas	0.02	0.03	1.18	0.54	26	Australia, USA, Germany, China, Greece, Panama	Bacteria involved in decaying chloramine residuals in a lab-scale system (3), integrated lake epilimnion from pooled DNA from lake samples (1), lake Walchen (1), enrichment culture of grass carp intestine contents (2), 60 and 55- day-old anaerobic fermentation course of <i>Microcystis</i> blooms (3), Dongping lake (1), Marathonas reservoir (2), lake Gatun (1), freshwater of pond during cyanobacterial bloom (1), lake Nanhu (2), Dianchi lake (1), freshwater bacterioplankton during bloom (1), Changjiang river (1)	yes	<i>Microcystis</i> , <i>Aphanizomenon</i> , <i>Anabaena</i>	JQ629566.1; JQ629528.1; JQ629493.1; HQ532043.1; JF275008.1; JF830233.1; GU559835.1; FJ612228.1; GQ340094.1; EU803336.1; KC253364.1; JN941771.1; JN941770.1; HQ860513.1; JF830219.1; GU559849.1; GQ340312.1; AY509418.1; AF429252.1; GU559800.1
Proteobacteria; Epsilonproteobacteria; Campylobacteriales; Campylobacteraceae; Arcobacter	0.01	0.03	0.03	1.47	> 100	China(1), Netherlands (9), India (1), Spain (2), Germany (12), china (1)	sewage of Da Qing oil field (1), supernatant of activated treating municipal wastewater (9), wastewater treatment plant (1), Sewage (2), spinach- processing plant (11), lake Dianchi (1)	not in the tested sequences	-	DQ452478.1; LK393088.1; LK393086.1; LK393080.1; LK393078.1; LK393063.1; LK393047.1; LK393035.1; LK392994.1; LK392705.1; KC161908.1; HE565361.1; NR_117570.1; JQ845798.1; JQ845797.1; JQ845792.1; JQ845789.1; JQ845783.1; JQ845778.1; JQ845776.1

Proteobacteria; unclassified Proteobacteria	0.04	0.06	0.68	3.35	> 100	China, Switzerland, Spain, USA,	Lake Taihu (1), methylotrophic bacteria in Lake Zurich (10), Lake Llebre (3), 'Eryuan' Hot Spring (1), Dongping lake (1), Lake Nera water column (1), Chesapeake Bay (4), Delaware Bay (6), Parker River (2), Biofilm (1), Wuliangshuai Lake (1), Holocene marine sediment (1), reclaimed wastewater (1),	not in the tested sequences	-	JN869216.1; KP687204.1; KP686947.1; KP686884.1; KP686820.1; KP686715.1; LN794158.1; LN681526.1; LN681522.1; LN681527.1; LN681523.1; LN681532.1; LN681528.1; LN681524.1; LN681533.1; LN681529.1; KC886884.1; HE857485.1; HM184969.1; FJ612111.1
Proteobacteria; Alphaproteobact eria; Rhodobacterales ; Rhodobacterace ae; Rhodobacter	0	0.01	1.81	0.75	20	China, Germany, United Kingdom, Canada, Spain, France	Day 0 and 55 sample during anaerobic degradation of <i>Microcystis</i> blooms and surface sediment mixture (4), 12, 55 and 60-day-old anaerobic fermentation course of <i>Microcystis</i> blooms (3), lake Taihu (1), Kelike lake (5), brackish samples from Weser estuary (1), wastewater treatment plant (1), lake Zhaling (1), lake Ontario (1), river sediment (1), lake Filia (1), mesophilic anaerobic digester which treats municipal wastewater sludge (1)	yes	not mentioned	HQ904129.1; HQ904237.1; HQ904233.1; GU559760.1; JN869047.1; GU559808.1; GU559790.1; HM128933.1; AY145582.1; HM129208.1; KC541086.1; FR774633.2; M128965.1; HM129032.1; EU703461.1; CU919934.1; KM031253.1; HE857093.1; KF963752.1; AB515715.1
Proteobacteria; Betaproteobacte ria; Burkholderiales; Comamonadace ae	1.65	2.22	0.03	0	> 100	Hungary, USA, China, Italy, India, Japan, Singapore, Germany, United Kingdom, Iran	Biofilm developed in a hydrocarbon contaminated groundwater (1), loamy soil of Eucalyptus forest (1), freshwater (2), apple roots (1), drinking water distribution system (1), low temperature hydrothermal oxides (1), Dianchi lake (1), ferromanganese deposit (1), groundwater (1), early biofilms on different surfaces in urban freshwater (2), paddy soil from mining area (1), endosphere of hybrid poplar (1), drinking-water biofilm (1), polychlorinated biphenyl-polluted soil (1), oak root (1), mine drainage water (1), epiphytic bacteria in rivers impacted by mining (1), Lake Taihu (1)	not in the tested sequences	-	KP686576.1; LN613108.1; NR_074623.1; HQ118277.1; CP001013.1; X97070.1; L33974.1; KP686602.1; KJ014569.1; KF827196.1; KF799961.1; JX406232.1; JQ291763.1; JQ923990.1; JN860412.1; HQ860520.1; JN820188.1; AB602771.1; JF277873.1; FJ890906.1
Proteobacteria; Betaproteobacte ria	0.01	0.28	8.93	2.65	4	China, USA	lake Nanhu (1), lake Inbanuma (1), lake Mendota (1), 55-day-old anaerobic fermentation course of <i>Microcystis</i> blooms (1)	yes	<i>Microcystis</i>	JN941777.1; AB599922.1; FJ827947.1; GU559809.1

Proteobacteria; Betaproteobacteria; Burkholderiales; Burkholderiaceae; Burkholderia	0.02	0.03	2.12	0.48	4 (96%)	China, USA, Nigeria	lake Nanhu (1), lake Inbanuma (1), lake Mendota (1), hydrocarbon-contaminated soil (1)	not in the tested sequences	-	JN941777.1; AB599922.1; FJ827947.1; KF917023.1
Proteobacteria; Alphaproteobacteria; Sphingomonadales; Erythrobacteraceae; Porphyrobacter	0.04	0.35	6.22	1.65	> 100	Iran, China, Russia, United Kingdom, USA, Argentina, India, Arctic	Dialysis fluid (1), petrochemical wastewater treatment plant sludge (1), cyanobacterial mat (1), biofilm in a full scale experimental drinking water distribution system (1), active hydrothermal field (1), stromatolite from Socompa lake (1), constructed wetland (1), soil (1), endolith at an Arctic thermal spring (4), Wakulla Spring (1), tap water (6), biofilm of stone in lake Baikal (1)	yes	not mentioned	KP265965.1; KP265959.1; KP174470.1; KF964597.1; KM262803.1; KJ782740.1; KJ740149.1; KF611948.1; KJ549090.1; KJ187462.1; AB690710.1; HG008894.1; JX258056.1; JX257995.1; JX257980.1; JX257191.1; KC157047.1; KC189653.1; JQ906003.1; JQ906001.1

**5. Annexes 5: Tableau II. S1**  
**Tableau S1 de l'Article 2 (Section II.3)**

OTU_id	NN taxo SILVA	# sequences ≥98% id	Geographic origin	Environmental source	Are they associated with cyanobacteria I blooms ?	What kind of cyanobacteria or other photosynthetic microorganisms?	Present in sample
OTU_3772	Bacteria;Bacteroidetes;Sphingobacteria;Sphingobacteriales;Chitinophagaceae;uncultured;uncultured_bacterium;	1	China	Lake Dianchi	Yes	Culture of Cylindrospermopsis	M3, M4
OTU_0281	Bacteria;Proteobacteria;Alphaproteobacteria;Rhizobiales;F0723;uncultured_bacterium;	20	China, Mongolia, Hungary, United States of America, Spitzberg, France, Japan	Marine water, aquifer with arsenic, ultrapure water in wastewater treatment, lake Chaohu, hospital water, river, soil			Ana1, Ana2, M1, M2, M3, P3, P4, P5
OTU_1309	Bacteria;Proteobacteria;Alphaproteobacteria;Rhodospirillales;I-10;uncultured_alpha_proteobacterium;	4	Germany, Italy, New Zealand	Alimentary canal of hydra, Ciliate in pond, river biofilm			Ana1, Ana2, Ana3, Aph1, Aph2, M2, M4, M5, P2, P3, P5
OTU_2225	Bacteria;Proteobacteria;Alphaproteobacteria;Rhizobiales;F0723;uncultured_bacterium;	9	Germany, United States of America	Lake, wastewater sludge, groundwater contaminated with MTBE, leaf litter in stream	Yes	Microcystis	Ana1, Ana2, Aph2, M1, M3, P1, P2, P3, P4, P5
OTU_3317	Bacteria;Proteobacteria;Alphaproteobacteria;Sphingomonadales;Sphingomonadaceae;Blastomonas;uncultured_bacterium;	>100	China, Brazil, Thailand, Portugal, United States of America	Freshwater biofilm, water treatment, Lemna, tap water and drinking water (antibiotics), marine water, aquifer sediment, biofilm in domestic water,	Yes	Microcystis and Chlorella	Ana1, Ana2, Ana3, M1, M2,



				human intestine and skin			M4, M5, P1, P2, P3, P5
<b>OTU_1890</b>	Bacteria;Bacteroidetes;Sphingobacteria;Sphingobacteriales;Chitinophagaceae;uncultured;uncultured_bacterium;	0					Ana1, M3, M4, P5
<b>OTU_2160</b>	Bacteria;Bacteroidetes;Sphingobacteria;Sphingobacteriales;NS11-12_marine_group;uncultured_bacterium;	23	China, Switzerland, United States of America, Sweden, Tibet	Sludge-seawage, lake Taihu, lake water	Yes	Microcystis and phytoplankton blooms	Ana1, Ana3, Aph1, Aph2
<b>OTU_0006</b>	Bacteria;Proteobacteria;Alphaproteobacteria;Rhizobiales;Rhizobiaceae;Rhizobium;uncultured_bacterium;	>100	Israel, Argentina, Taiwan, China, India, Tunisia, The Philippines, United Kingdom, Burkina Faso	Chironome eggs (freshwater), floating pumice stone, wastewater, river, plant nodules, rice roots, spring, skin, marine water, lake water			M1, M2, M3, M5, P1, P2, P4, P5
<b>OTU_2572</b>	Bacteria;Proteobacteria;Gammaproteobacteria;Xanthomonadales;Xanthomonadaceae;Thermomonas;uncultured_bacterium;	66	France, China, India, Bulgaria, Indonesia, Turkey, Thailand, United States of America	Lake water, hot springs, particules in eutrophic lake, biofilm freshwater, stormwater canal, wastewater, shrimp pond, skin, floating mat	Yes	Microcystis and other cyanobacteria (oil degradation)	M3, M4, M5, P2, P4, P5
<b>OTU_3130</b>	Bacteria;Proteobacteria;Alphaproteobacteria;Sphingomonadales;Sphingomonadaceae;Blastomonas;uncultured_bacterium;	>100	China, Germany, Portugal	Freshwater biofilms, ocean water, lake, tap water, drinking water	Yes	Culture of Microcystis, Chlorophyte Blooms, Microcystis Blooms	Ana2, Ana3, Aph1, M1, M2, M3, M4, M5, P1, P2, P3, P5
<b>OTU_1700</b>	Bacteria;Proteobacteria;Alphaproteobacteria;Rhodospirillales;Acetobacteraceae;Roseococcus;uncultured_Antarctic_bacterium_LB3-94;	15	China, Argentina, Korea, Tibet, Japan, Antarctic	Lake Taihu Sediments, floating pumice stone, lake, sewer, Antarctic lake, Antarctic hole, activated carbon in water treatment	?		M5

<b>OTU_3340</b>	Bacteria;Proteobacteria;Alphaproteobacteria;Rhizobiales;F0723;uncultured_bacterium;	15	Italy, China, United States of America	Microbiota of Ciona intestinalis, lake Chaohu particules, swimming pool water, skin, biocathode, anaerobic sludge			Ana1, Ana2, M1, M2, M3, P3, P4, P5
<b>OTU_2087</b>	Bacteria;Proteobacteria;Alphaproteobacteria;Rhizobiales;Rhizobiaceae;Rhizobium;Azospirillum_sp.;	>100	United States of America, Thailand, India, Japan, Italy, Egypt, Tibet	Skin, Lemna, floating pumice stone, root nodules, permafrost soil, human ileum, attached particules in Dianchi lake	?		Ana1, Ana2, Ana3, M1, M2, M3, P1, P2, P4, P5
<b>OTU_1687</b>	Bacteria;Proteobacteria;Alphaproteobacteria;Rhizobiales;FukuN57;uncultured_bacterium;	17	United States of America, China, Russia, Spain	Epiphytic bacteria, floating pumice stone, lymnaea intestine, attached particules in Dianchi lake, epilithic biofilm, stone biofilms	?		Aph2, M1, M3, P2, P3, P4, P5
<b>OTU_2298</b>	Bacteria;Proteobacteria;Gammaproteobacteria;Pseudomonadales;Pseudomonadaceae;Pseudomonas;Pseudomonas_fluorescens;	>100	France, India, Denmark, Japan, China, Hungary, United States of America	Arctic cyanobacterial mat, human microbiote, drinking water, water, soil, eel water, glacier, groundwater, river, roots, rhizosphere, Antarctic soil, fish intestine, lake biofilms, soil	Yes	Cyanobacteria mats	Ana1, M3, M5, P1, P5
<b>OTU_3377</b>	Bacteria;Proteobacteria;Alphaproteobacteria;Rhodobacterales;Rhodobacteraceae;Rhodobacter;uncultured_bacterium;	>100	United States of America, China, Germany, Finland	Floating pumice stone, wasp intestine, eutrophic lake, epiphytic bacteria, rhizosphere, lake Dianchi, wastewater, diatoms, groundwater, canal water, sludge, wastewater biofilm, glacier	?		Ana3, Aph2, M1, M3, M4, M5, P1, P2, P3
<b>OTU_0925</b>	Bacteria;Proteobacteria;Alphaproteobacteria;MNG3;uncultured_bacterium;	47	China, Netherlands, United States of America, Australia, Japan, Germany	Microcystis Blooms, rice root, Arctic soil, pond sediments, biofilm reactor, groundwater, soil, groundwater, activated sludge, mine drainage, algal bacterial consortia, soil, drinking	Yes	Microcystis and association with algae	Ana1, Ana2, Ana3, Aph2, M2

				water, Antarctic, leaf litter in lake, drinking water distribution system			
<b>OTU_1093</b>	Bacteria;Proteobacteria;Alphaproteobacteria;Caulobacterales;Caulobacteraceae;Brevundimonas;uncultured_alpha_proteobacterium;	>100	China, Russia, Ireland, United States of America, Spain	Mine soil, ice, groundwater, bacterial biofilm, marine sediment, drinking water biofilm, human intestine, lake Taihu, Microcystis blooms, wastewater, human skin, marine sediments, clean room floor, floating pumice stone, seawater, human ileon	Yes	Microcystis	Ana2, M2
<b>OTU_2750</b>	Bacteria;Proteobacteria;Alphaproteobacteria;Sphingomonadales;Erythrobacteraceae;Porphyrobacter;uncultured_bacterium;	>100	Argentina, China, France, United States of America, Korea, Germany, Spain, Japan	River, floating sponge, activated sludge, aquatic sediments, rhizosphere, deep sea water, microbial mats, drinking water, sea water, Weser estuary, lake Constance	?		Ana1, M3, M4, M5, P1, P2, P5
<b>OTU_0847</b>	Bacteria;Proteobacteria;Alphaproteobacteria;Rhizobiales;Rhizobiaceae;Rhizobium;Agrobacterium_sp._PNS-1;	>100	Argentina, Russia, United States of America, Australia, China, Germany, Russia, Japan	Floating sponge, thermal spring, canal sediments, aquifer sediments, lake water, China sea, rhizosphere, TCE contaminated site, human ileum, atopic dermatite	Yes	Microcystis (Dziallas and Grossart 2011), algae symbionte (Watanabe et al. 2008), associated to Micractinium pusillum (Chlorophyte)	Aph2, M1, M3, M4, P1, P2, P4, P5
<b>OTU_0533</b>	Bacteria;Proteobacteria;Alphaproteobacteria;Sphingomonadales;Sphingomonadaceae;Novosphingobium;uncultured_bacterium;	2	Germany	Lake	?	Associated to Parachlorella beijerinckii	Ana1, Ana2, Ana3, Aph1, M1, M5, P4, P5
<b>OTU_2841</b>	Bacteria;Proteobacteria;Alphaproteobacteria;Rhodospirillales;Rhodospirillaceae;Azospirillum;uncultured_bacterium;	9	China, United States of America, Germany	Lake Taihu, water, lake water, freshwater pond sediments, organic aggregate in Elbe river, bioreactor, lake Constance	?	Associated to Diatoms (Bruckner 2008)	Ana1, Ana2, M1, M2, P4

<b>OTU_2818</b>	Bacteria;Proteobacteria;Alphaproteobacteria;Caulobacteriales;Caulobacteraceae;Brevundimonas;uncultured_alpha_proteobacterium;	9	Germany, China, Spain, United States of America, Israel	Lake, snow, hot spring, drinking water	Yes	Microcystis (Dziallasand Grossart 2011)	M2, M4, P5
<b>OTU_3156</b>	Bacteria;Bacteroidetes;Cytophagia;Cytophagales;Cytophagaceae;Flexibacter;uncultured_Sphingobacteria_bacterium;	10	China, Sweden	Lake Xigyun, lake groundwater	?	Microcystis bloom	Aph2, M2, P2
<b>OTU_0246</b>	Bacteria;Proteobacteria;Gammaproteobacteria;Xanthomonadales;Xanthomonadaceae;Stenotrophomonas;Stenotrophomonas_maltophilia;	0					Ana1, M1, M5, P2, P3, P5
<b>OTU_0822</b>	Bacteria;Proteobacteria;Alphaproteobacteria;Rhodospirillales;I-10;uncultured_alpha_proteobacterium;	6	China, France	Water from a copper mine, lake Taihu, Lake Villerest, lake Dianchi	Yes	Microcystis bloom (Parvenn et al. 2013)	Ana1, Ana2, Ana3, P2, P3
<b>OTU_2822</b>	Bacteria;Proteobacteria;Betaproteobacteria;Burkholderiales;Comamonadaceae;Hydrogenophaga;uncultured_bacterium_mle1-6;	0					Ana1, Ana2, Ana3, Aph1, Aph2, M2, P2
<b>OTU_1478</b>	Bacteria;Proteobacteria;Gammaproteobacteria;Pseudomonadales;Pseudomonadaceae;Pseudomonas;Pseudomonas fluorescens;	>100	Argentina, China, Russia, United States of America	Floating sponge, river water, polluted soil, biofilms, rhizosphere, Arctic cyanobacterial mats, groundwater, atopic dermatitis, sludge	Yes	Cyanobacteria mats	Ana1, Aph1, M3, P1, P5
<b>OTU_2993</b>	Bacteria;Bacteroidetes;Cytophagia;Cytophagales;Cytophagaceae;Flexibacter;uncultured_bacterium;	8	Argentina, China, Korea	Floating sponge, wastewater, lake			Ana2, Aph1
<b>OTU_1872</b>	Bacteria;Proteobacteria;Alphaproteobacteria;Sphingomonadales;Sphingomonadaceae;Blastomonas;uncultured_bacterium;	>100	Spain, Finland, China, Brazil, Germany, United States of America	Biofilm in cave, photobioractor, lake, lake biofilm, water treatment system, hospital tap water, aquifer sediment, skin microbiome, showerhead biofilm	Yes	Associated to Chlorella cultures, Scenedesmus, Microcystis (Dziallas	M1, M2, M4, P1, P2, P3

						and Grossart 2011)	
<b>OTU_3071</b>	Bacteria;Proteobacteria;Alphaproteobacteria;Rhodospirillales;Uncultured_Rhodospirillales_bacterium;	12	Japan, Germany, Mexico, China, Italy, New Zealand	Sludge, rice paddy soil microcosm, rice field, lake Xingyun, lake Erhai, cyanobacterial mucilage in hypereutrophic lake, hydre, Protiste Pseudomicrothorax, freshwater stream biofilm	Yes	Cyanobacteria mucilage, Microcystis Blooms	Ana3, Aph1, Aph2
<b>OTU_1307</b>	Bacteria;Bacteroidetes;Sphingobacteria;Sphingobacteriales;NS11-12_marine_group;uncultured_bacterium;	1	Switzerland	Lake, sludge	Yes	Planktothrix rubescens	Ana3, Aph1, Aph2
<b>OTU_2891</b>	Bacteria;Proteobacteria;Gammaproteobacteria;Xanthomonadales;Xanthomonadaceae;Silanimonas;uncultured_bacterium;	55	United Kingdom, Singapore, China, United States of America, Japan, Antarctic, Germany, India	Surface sediments, freshwater biofilms, lake Kelike, groundwater, lake Dianchi, Taihu and Xingyun hu, particles attached in lake Dianchi, Microcystis blooms, epiphytic biofilm, glacial hole, lake Constance, human intestine, contaminated soil, hot spring	Yes	Anaerobic degradation of Microcystis bloom, Microcystis bloom, associated to Diatoms	P1, P2, P3, P4
<b>OTU_1664</b>	Bacteria;Proteobacteria;Alphaproteobacteria;Caulobacteriales;Caulobacteraceae;Brevundimonas;uncultured_bacterium;	27	China, United States of America	Lake, human ileum-associated microbia, human skin, drinking water distribution systems, travertine depositional facies			M4, P5
<b>OTU_3289</b>	Bacteria;Proteobacteria;Betaproteobacteria;Nitrosomonadales;Nitrosomonadaceae;uncultured;uncultured_bacterium;	7	Denmark, China, Germany, France, Belgium	Activated sludge, cryoconites on a glacier in Central Asia, lake Buerger, wastewater sludge, biofilm fouling in membrane bioreactors	Yes	Microcystis bloom (Dziallas and Grossart 2011)	Aph1
<b>OTU_2600</b>	Bacteria;Proteobacteria;Gammaproteobacteria;Xanthomonadales;Xanthomonadaceae;Silanimonas;uncultured_bacterium;	27	United Kingdom, Singapore, China, Mexico, United States of America, Japan, Israel, Antarctic	Alkaline microcosm, biofilm, water of high-mountain lake, water-filled limestone sinkholes, groundwater, stormwater canal, stream water, lake Taihu, particle-attached bacteria,	Yes	60-day-old anaerobic fermentation of Microcystis bloom (Xing et al. 2011)	M3, P1, P2, P3, P4, P5

				anaerobic incubation of Microcystis, chlorinated tap water, chironomid egg, hot spring, chromium contaminated soil, serpentinizing springs, glacial cryoconite hole			
<b>OTU_1705</b>	Bacteria;Proteobacteria;Betaproteobacteria;Burkholderiales;Comamonadaceae;Hydrogenophaga;Hydrogenophaga_sp._D11-24b2;	>100	Austria, United States of America, China, Japan, Germany	Drainage water from a magnesite mine, human skin, freshwater Biofilm, aerobic granular sludge, groundwater, activated sludge, large-discharge, Ethiopian soda lakes carbonate			Ana1, Ana2, Ana3, Aph1, M3, M4, P2, P3, P4, P5
<b>OTU_0866</b>	Bacteria;Proteobacteria;Alphaproteobacteria;Rhizobiales;Rhizobiaceae;Rhizobium;uncultured_bacterium;	>100	United States of America, Thailand, Italy, India, Mexico, China, Portugal	Human skin, duckweed, agricultural soil, rhizospheric soil, stem nodule, root nodule, mine tailing soil, bacteria associated with Bursaphelenchus xylophilus, Urgeirica mine, water and sediments			Ana1, Ana2, M1, M2, P1, P2, P4, P5
<b>OTU_1914</b>	Bacteria;Proteobacteria;Alphaproteobacteria;Sphingomonadales;Sphingomonadaceae;Novosphingobium;uncultured_bacterium;	2	Germany	Bacteria associated with Parachlorella beijerinckii and Chlorella vulgaris			Ana1, Ana2, Ana3, Aph1, M2, P4, P5
<b>OTU_2661</b>	Bacteria;Proteobacteria;Alphaproteobacteria;Rhodobacterales;Rhodobacteraceae;uncultured;Rhodobacter_sp._oral_taxon_C30;	55	China, Egypt, Hungary, South Korea, France, Greece, Israel, Spain, Singapore, India	Aerobic granular sludge, lake, Microcystis blooms, Choricystis minor, activated sludge in lab-scale reactor, ornamental fish aquaria, stormwater canal, biofilm, Elodea nuttallii rhizosphere mercury contaminated sediments, chironomid egg masses, Anoxic Sediment of a Sub-saline	Yes	Microcystis bloom (Parveen et al. 2013; Cai et al. 2013), algae (Marquard et al. Unpubli), Elodea nuttallii (Regier et al. 2013), 55-day-old anaerobic	M3, M4, M5, P3

				Shallow Lake, freshwater biofilm, particle-attached bacteria, freshwater bacterioplankton, anaerobic fermentation of Microcystis Blooms, Mahananda river water		fermentation of Microcystis bloom (Xing et al. 2011)	
<b>OTU_2523</b>	Bacteria;Proteobacteria;Alphaproteobacteria;Caulobacteriales;Caulobacteraceae;Brevundimonas;uncultured_alpha_proteobacterium;	>100	China, United States of America, Germany, Ireland	Mine tailing soil, ice core, oil-contaminated groundwater, freshwater biofilm, surface marine sediment, drinking water distribution system, human ileum-associated microbia, lake water, associated with the cyanobacterium Microcystis, wastewater, human skin, air samples	Yes	Microcystis bloom (Dziallas and Grossart 2011)	M2
<b>OTU_2046</b>	Bacteria;Proteobacteria;Gammaproteobacteria;Xanthomonadales;Xanthomonadaceae;Silanimonas;uncultured_bacterium;	12	Cyprus, China, France	Hyperalkaline Allas springs, stream water, surface sediments of an infiltration bassin, hot spring, lake water, Microcystis blooms		Microcystis bloom (Parveen et al. 2013)	P1, P2, P3
<b>OTU_0100</b>	Bacteria;Bacteroidetes;Flavobacteria;Flavobacteriales;Flavobacteriaceae;Flavobacterium;uncultured_Flavobacterium_sp.;	1	United States of America	Human skin			Ana3, Aph1
<b>OTU_2164</b>	Bacteria;Proteobacteria;Alphaproteobacteria;Rhodospirillales;Acetobacteraceae;Roseomonas;uncultured_bacterium;	10	South Korea, Japan, New Zealand, Greece, United States of America, China, Netherlands	Water sample of pond, stream, freshwater stream biofilm, phyllosphere, drinking water distribution system, coalbed, granular activated carbon filters in water treatment, groundwater biofilm, drinking water			Ana2, Ana3, Aph1, Aph2, M3, P2, P3
<b>OTU_3636</b>	Bacteria;Bacteroidetes;Sphingobacteria;Sphingobacteriales;NS11-12_marine_group;uncultured_bacterium;	9	China, Switzerland, Sweden, United States of America	Active sludge of sewage treatment plant, Microcystis blooms, lake Zurich, spring blooms, freshwater from Lake Ekoln, hypertrophic freshwater lake, lake Michigan	Yes	Microcystis bloom (Li et al. 2012), phytoplankton bloom (Eckert et al. 2012)	Ana3, Aph1, Aph2

<b>OTU_2731</b>	Bacteria;Proteobacteria;Betaproteobacteria;Rhodocyclales;Rhodocyclaceae;Methylovorsilis;uncultured_bacterium;	>100	China, India, Roumania, United States of America, Spain	Bacterial symbionts, salivary glands Hyalessa maculaticollis, guts of workers Camponotus japonicus, activated sludge, freshwater biofilm, sediment from high arsenic groundwater aquifer, water and sediment samples of hot springs, river sediment, water samples from oil well, production water of petroleum reservoir, honeydew of Cinara tujafilina, geothermal microbial mat, aquifer groundwater, soil, gastrointestinal tract turbot, drinking water distribution system			Ana3, Aph1, M1, M2, M5, P2, P4
<b>OTU_1354</b>	Bacteria;Proteobacteria;Alphaproteobacteria;Rhodospirillales;Acetobacteraceae;Roseomonas;uncultured_bacterium;	6	South Korea, Japan, New Zealand, Greece, United States of America	Water sample of pond, stream (1), freshwater stream biofilm, phyllosphere, drinking water distribution system			Ana3, Aph1, Aph2, M3, M5, P1, P2, P5
<b>OTU_2856</b>	Bacteria;Bacteroidetes;Sphingobacteria;Sphingobacteriales;Chitinophagaceae;uncultured;uncultured_bacterium;	7	China, United States of America	Soil, canal and flood waters, rhizosphere, PAHs polluted soil			Ana1, Aph2, M4, P4
<b>OTU_0895</b>	Bacteria;Proteobacteria;Alphaproteobacteria;Rhizobiales;Family_Incertae_Sedis;Norcella;uncultured_bacterium;	>100	Germany, Spain, South Africa, United States of America, South Korea, China	Marine sponge associated bacteria, estuarine and a hypersaline microbial mat with cyanobacteria, water in terrestrial deep subsurface, sea water, sediments/sulfide in South Atlantic	Yes	Synechocystis, Chroococcus, Gloeocapsa, Microcystis, Pleurocapsa, Oscillatoria, Microcoleus, Halomicronema, Leptolyngbya,	M2, M3, P1, P2, P3



						Pseudoanabaena	
<b>OTU_2660</b>	Bacteria;Proteobacteria;Alphaproteobacteria;Rhizobiales;Bradyrhizobiaceae;Bosea;Bosea_sp._K2_STR;	>100	Pakistan, Argentina, Australia, China, United States of America	Rhizosphere, lake, sediment of an anaerobic aquifer, plant-associated bacteria, periphyton rivers, biofilter used in odor treatment at landfill, tallgrass prairie soil			Ana2, Aph1, Aph2, M2, M3, M4, M5, P2, P3, P4, P5
<b>OTU_1311</b>	Bacteria;Proteobacteria;Alphaproteobacteria;Rhodospirillales;I-10;uncultured_Rhodospirillales_bacterium;	7	Mexico, Japan, Germany, China	Rice field, methane-consuming sludge, soil mesocosm, bacterioplankton sample from lake Xingyunhu, Erhai Lake			Ana2, Ana3, Aph1, Aph2
<b>OTU_2952</b>	Bacteria;Proteobacteria;Alphaproteobacteria;Rhodospirillales;I-10;uncultured_Rhodospirillales_bacterium;	6	Mexico, Japan, Germany, China	Rice field, methane-consuming sludge, soil mesocosm, bacterioplankton sample from lake Xingyunhu			Ana3, Aph1, Aph2, P5
<b>OTU_3458</b>	Bacteria;Proteobacteria;Betaproteobacteria;Burkholderiales;Alcaligenaceae;Achromobacter;uncultured_beta_proteobacterium;	>100	United States of America, India, China	Human ileum, diatom cultures, hydrothermal plume and surrounding water, freshwater biofilm, argillaceous halite, river, wastewater, shallow water hydrothermal, soil, a metropolitan subway system, sea water			Ana1, Ana2, M3, M4, M5, P1, P2, P3, P4, P5
<b>OTU_1306</b>	Bacteria;Proteobacteria;Alphaproteobacteria;Rhodobacterales;Rhodobacteraceae;Rhodobacter;uncultured_bacterium;	44	China, Italy, Russia, United States of America, Israel, Japan, France, Mexico, Ethiopia	Sediments, pond water, wastewater treatment, thermal spring, periphyton, Hydrilla verticillata and Vallisneria americana, chironomid egg masses, stream of Dianchi Lake, lake Taihu, lake Charles, lake Pontchartrain, Swine wastewater ditch, soil,	Yes	Microcystis bloom (Parveen et al. 2013; Cai et al. 2013)	Ana3, Aph1, M3, M4, M5, P3, P5

				Microcystis blooms, carp intestine, particle-attached bacterial sample from lake, bacterioplankton sample from lake, rhizosphere, industrial circulating cooling water system, hydrogen-producing reactor, clinical specimens, lake Xingyunhu particle-attached bacteria sample, Dongping lake sediment			
OTU_1333	Bacteria;Proteobacteria;Gammaproteobacteria;Xanthomonadales;Xanthomonadaceae;Stenotrophomonas;Stenotrophomonas_maltophilia;	6	China, United States of America	Petrochemical wastewater treatment, cyanobacterial mat, subsurface sediments, river sediments, biological activated carbon	Yes	Cyanobacterial mats	Ana1, M1, M4, M5, P2, P3, P5
OTU_3095	Bacteria;Bacteroidetes;Flavobacteria;Flavobacteriales;Flavobacteriaceae;Flavobacterium;uncultured_bacterium;	51	Thailand, Korea, Lithuania, United States of America, Austria, Poland, Arctic sea, China	Wood debris, water, salmon intestinal microbiota, lake water, floating pumice, stream, mesotrophic artificial lake, root and rhizosphere, river, disturbed arable and landfill soils, Arctic sea ice-melt pond, oyster mushroom, sludge, microfiltration system, bromeliad-tank soil			Aph1, P5
OTU_0524	Bacteria;Proteobacteria;Alphaproteobacteria;Caulobacteriales;Caulobacteraceae;Brevundimonas;uncultured_alpha_proteobacterium;	3	China, Bolivia, United States of America	Lake Taihu particle-attached bacteria, surface snow blocks, Yellowstone Hot Springs	?		M2, M4
OTU_0774	Bacteria;Actinobacteria;Actinobacteria;Micrococcales;Microbacteriaceae;Yonghaparkia;bacterium_BAC205;	23	Spain, Italy, China, United States of America, Estonia	Roumi Lake, reverse osmosis membrane river water, magnetite drainage, periphyton, subsurface microbial community, phyllosphere, human skin, surface sediment of Taihu lake, waste from oil-shale	?		M1, M2, M3, M4, M5, P1, P2, P3, P5

<b>OTU_0737</b>	Bacteria;Proteobacteria;Gammaproteobacteria;Xanthomonadales;Sinobacteraceae;uncultured;uncultured_bacterium;	5	United States of America, Germany, China, Taiwan, China	Hydrilla verticillata and Vallisneria americana in a Freshwater, biofilm sampled in a treatment system for groundwater contaminated with BTEX, MTBE and ammonium, biofilms in a full-scale vermifilter, tufa microbe, particle-attached bacterial from lake			Ana2
<b>OTU_2663</b>	Bacteria;Proteobacteria;Alphaproteobacteria;Rhizobiales;Xanthobacteraceae;Pseudoxanthobacter;uncultured_alpha_proteobacterium;	6	Germany, United States of America, Antarctic	Sediment from slow sand filtration of wastewaters, gut, aquatic moss pillars, skin-volar forearm			Ana1, Ana2, Ana3, Aph1, Aph2, M1, M2
<b>OTU_3492</b>	Bacteria;Proteobacteria;Gammaproteobacteria;Xanthomonadales;Xanthomonadaceae;Silanimonas;uncultured_bacterium;	56	United States of America, Singapore, China, Japan, Israel, United Kingdom, Germany, India	Groundwater from tectonically-formed cavern, freshwater from stormwater canal, stream water, Lake Taihu, biofilm, particle-attached bacterial from lake, bacterioplankton sample from lake, 60-day-old anaerobic fermentation course of Microcystis Blooms, chlorinated tap water, alkaline microcosm samples, water of high-mountain lake, lake Constance, lake Dianchi, mucosa-associated microbiota, water and sediment samples of hot springs, honeydew of Cinara tujaefilina, petroleum deposit	Yes	Anaerobic fermentation course of Microcystis bloom (Xing et al. 2011)	P1, P2, P3
<b>OTU_3457</b>	Bacteria;Bacteroidetes;Cytophagia;Cytophagales;Cytophagaceae;Flexibacter;uncultured_Bacteroidetes_bacterium;	2	United States of America	Fungus symbionts, aeration tank of wastewater treatment			Aph1, Aph2, M5
<b>OTU_3637</b>	Bacteria;Bacteroidetes;Sphingobacteria;S	2	United States of	Skin-volar forearm, surface sediments			M4

	phingobacteriales;Chitinophagaceae;uncultured;uncultured_bacterium;		America, France	of an infiltration bassin			
OTU_3488	Bacteria;Proteobacteria;Gammaproteobacteria;Xanthomonadales;Xanthomonadaceae;Stenotrophomonas;Stenotrophomonas_maltophilia;	>100	China, India, Red sea, Thailand, Canada, Turkey, Bangladesh, United States of America, Germany, Brazil, Austria	Silage, rhizosphere soil, red sea sponges, domestic water storage containers, slaughterhouse waste soil, receiving river of the antibiotic production wastewater effluent, lake Ontario surface, travertines, diabetic foot infection, oil refinery soil, contaminated soil, biogas plants, river water and sediment, rumen, skin-volar forearm, water mass above the active hydrothermal field, Amazon dark earth			P5
OTU_2681	Bacteria;Proteobacteria;Alphaproteobacteria;Caulobacteriales;Caulobacteraceae;Brevundimonas;uncultured_alpha_proteobacterium;	>100	China, Antarctic, United States of America, Canada, Slovenia, Sweden	Marine snow, soft coral, soil of Grove Mountains, particle associated extreme deep-ocean Puerto Rico Trench, Pearl River estuary sediment, intestine of grass carp, Scenedesmus obliquus (algues)-bacetria, oil-contaminated groundwater, oil production water, simulated biodiesel storage tank, biofilm using pure biodiesel as carbon source, the Gulf of Trieste, Ice covered Antarctic lakes, Baltic Sea, surface			Ana1, Ana2, M4, P4
OTU_0338	Bacteria;Proteobacteria;Alphaproteobacteria;Rhodobacterales;Rhodobacteraceae;Cattellibacterium;Cattellibacterium_sp._JPB-2.07;	10	Ethiopia, United States of America, China, France, Japan, Ireland, Korea	Sludge and activated sludge, Hydrilla verticillata and Vallisneria, mesophilic anaerobic digester, oil field, freshwater of Woopo wetland			Aph1, Aph2, M5, P1
OTU_2574	Bacteria;Bacteroidetes;Sphingobacteria;Sphingobacteriales;Chitinophagaceae;uncultured;uncultured_bacterium;	32	China, United States of America, Vietnam,	Soil, rhizosphere, lake water, glacier sediment, skin, biofilm rural sewage,			Ana1, M4, P5

	tured;uncultured_bacterium;		Germany, Italy, Japan	lake/river sediment, alpine wetland, percolating water, biofilm freshwater			
<b>OTU_2034</b>	Bacteria;Proteobacteria;Gammaproteobacteria;Pseudomonadales;Pseudomonadaceae;Pseudomonas;Pseudomonas_aeruginosa;	>100	China, India, Poland, Netherlands, Canada, Denmark, United States of America, United Kingdom, Romania, Germany, Mexico	Paddy soil, rhizosphere soil, biofilm groundwater, pulp biofilm, activated wastewater/sludge, roots, AMFungi, river water, catfish intestine, biofilm water, aerated sediments, sludge anaerobic, wasps, raw milk, undef			P2, P5
<b>OTU_2916</b>	Bacteria;Proteobacteria;Alphaproteobacteria;Rhodospirillales;Acetobacteraceae;Roseococcus;uncultured_Antarctic_bacterium_LB3-94;	15	China, Argentina, United States of America, Antarctic	Sediment, lake bacterioplankton, lake water, alpine lake water ultraoligoth, Antarctica lake, high altitude granite vault, pumice, corroded concrete sample, glacial hole, drinking water C treatment			M5
<b>OTU_2214</b>	Bacteria;Proteobacteria;Alphaproteobacteria;Rhodospirillales;L-10;uncultured_Rhodospirillales_bacterium;	0					Ana1, Ana3, Aph1, Aph2
<b>OTU_2052</b>	Bacteria;Proteobacteria;Gammaproteobacteria;Pseudomonadales;Pseudomonadaceae;Pseudomonas;Pseudomonas_plecoglossicida;	>100	India, China, Bangladesh, Thailand, Egypt, Germany	Root, biological degreasing system, inoculated rice shoot with cyano, soil, rhizosphere, contaminated river sediment, foot infection, domestic water container, biogas plant, sidi kerir	Yes		M5, P2, P3, P4
<b>OTU_1789</b>	Bacteria;Proteobacteria;Alphaproteobacteria;Sphingomonadales;Erythrobacteraceae;Erythrobacter;uncultured_bacterium;	>100	China, United States of America, Argentina, United Kingdom, Italy	Lonar sediments surface rock, soil, lake bacterioplankton, mesothermic microbe mat, pumice, lake epilimnion, water lake, biofilm drinking water, sediment lake, sulfidic spring, shrimp sediment, drinking water system, skin dermatitis, lake particule attached bacteria		Spirulina	Ana1, M3, M5, P2

<b>OTU_3394</b>	Bacteria;Proteobacteria;Alphaproteobacteria;Sphingomonadales;Sphingomonadaceae;Blastomonas;uncultured_bacterium;	>100	South Korea, China, Finland	Microcystis culture, fresh water biofilm, lake water with Microcystis blooms, ocean water, host microcinium pusillum, water, shallow lake, biofilm black ferromanganese, drinking water system, non axenic culture of Chlorella	Yes	Microcystis bloom (Dziallas and Grossart 2011)	Ana2, Ana3, M1, M2, M3, M4, P1, P2, P3
<b>OTU_2716</b>	Bacteria;Proteobacteria;Alphaproteobacteria;Sphingomonadales;Sphingomonadaceae;Sandaracinobacter;Sandaracinobacter_sibiricus;	12	China, Japan, France	Periphyton, water in reed belt, eutrophic shallow lake bacterioplankton, host sandoracinobacter, sludge swinne wastewater, anaerobic wastewater, bioremediation hydrocarbon contaminated soil, heavy oil seeps, wastewater of oil treatment plant			M4, M5, P5
<b>OTU_0995</b>	Bacteria;Proteobacteria;Alphaproteobacteria;Rhodospirillales;Family_Incertae_Sedis; Oleomonas;uncultured_Oleomonas_sp.;	12	Romania, China, Thailand, Finland, Kuwait	Cave water, river freshwater, lake, municipal waste compost, anaerobic wastewater biofilm, sewage	Yes	Microcystis bloom (Shi et al. 2009)	Ana1, Ana2, Ana3, P4, P5
<b>OTU_0991</b>	Bacteria;Proteobacteria;Alphaproteobacteria;Sphingomonadales;Erythrobacteraceae; Erythrobacter;uncultured_bacterium;	>100	China, United States of America, Argentina, United Kingdom, Italy	Lonar sediments surface rock, soil, lake bacterioplankton, mesothermic microbe mat, lake water, pumice, biofilm drinking water, sediment lake, sulfidic sprig, shrimp sediment, industrial coolingwater sys, skin dermatite, lake attached particule bacteria			M5, P2
<b>OTU_3690</b>	Bacteria;Proteobacteria;Alphaproteobacteria;Rhodospirillales;wr0007;alpha_proteobacterium_BAC233;	>100	Tunisia, China, France, United States of America, Netherlands, Costa Rica, Trinidad and Tobago	Wastewater treatment, freshwater biofilm, aerobic granular sludge, ground water contaminated oil, lake water, contaminated soil, skin dermatite, activated sludge,			Ana1, Ana2, Ana3, Aph1, Aph2,

				groundwater, methane oxidizing DHS reactor, guts, drinking water treatment, anaerobic wastewater sludge, rhizosphere, lake treatment sewage, lake bacterioplankton, roots, showerhead swab, marine water, digestive of zebrafish, coral surface mucus			M1, M4, P2, P4
<b>OTU_1495</b>	Bacteria;Proteobacteria;Betaproteobacteria;Burkholderiales;Comamonadaceae;Hydrogenophaga;Hydrogenophaga_sp._CL-9.06;	>100	China, France, Indonesia	Freshwater biofilms, soil biofilm, human gastrointestinal, contaminated soil, holocene marine sediments, marine hot springs, algicidal enrichment culture showing activity against microcystis aeruginosa, port water, lake water	Yes	Microcystis bloom	Ana1, Ana2, Ana3, Aph2, M2
<b>OTU_0861</b>	Bacteria;Proteobacteria;Alphaproteobacteria;Sphingomonadales;Sphingomonadaceae;Blastomonas;uncultured_bacterium;	>100	China, Spain, France, United States of America, Argentina, Japan, Indonesia, India	Lake water, sea water, deterioration stone, soil, wastewater oil treatment, lake epilimnion, water, pumice, groundwater, coastal hot spring water, contaminated soil	Yes	Microcystisbloom (Li et al. 2012)	Aph1, Aph2, M3, P2
<b>OTU_1851</b>	Bacteria;Bacteroidetes;Sphingobacteria;Sphingobacteriales;Chitinophagaceae;Hydrothalea;uncultured_bacterium;	>100	China, United States of America, Argentina, France, Estonia, Japan	Eutrophic lake bacterioplankton, drinking water treatment, pumice, lake water associated with microcystis, water column, surface freshwater lake, grass carp intestine, drinking water system, eutrophic lake particle attached bacteria, oil contaminated groundwater, activated sludge, leachate concentrate, lake sediment, contaminated wastewater, human gastrointestinal, wetland, groundwater	Yes	Microcystis bloom (Parveen et al. 2013)	Ana3

<b>OTU_1783</b>	Bacteria;Proteobacteria;Alphaproteobacteria;Caulobacteriales;Caulobacteraceae;Caulobacter;uncultured_bacterium;	>100	Argentina, Portugal, Mexico, Antarctic, China, United States of America, Malaysia, The Philippines, Mongolia, Poland	Water, soil, mineral water aquifer, rhizosphere aquatic plants, sea sediments, surface sea water, hydrothermal vent, rhizosphere, root endosphere, subsurface aquifer sediments, crude oil reservoir, flooded rice field, Human gastrointestinal, lake waste associated with Microcystis blooms, Texas state well in karst aquifer	Yes	Microcystis bloom (Li et al. 2012)	M4, P2, P3, P5
<b>OTU_2829</b>	Bacteria;Proteobacteria;Alphaproteobacteria;Rhodobacteriales;Rhodobacteraceae;Rhodobacter;uncultured_Rhodobacteraceae_bacterium;	>100	Hongry, South Korea, France, China, Singapor, India	Sludge, lake waste, freshwater wetlands, lake water, eutrophic bay, activated sludge, ornamental fish aquaria, concrete surface storm water canal, biofilm attached sulfur iron, mucilaginous cyanobacterial aggregates in eutrophic lake, rhizosphere contaminated mercury, biofilm grown on polyvinyl chloride, lake water particulate attached bacteria, bacterioplankton eutrophic lake, fermentation microcystis blooms, river water, mesophilic anaerobic sludge, zebrafish digestive	Yes	Microcystis bloom (Parveen et al. 2013; Xing et al. 2011)	M3, M4, M5, P3, P5
<b>OTU_2063</b>	Bacteria;Proteobacteria;Alphaproteobacteria;Sphingomonadales;Sphingomonadaceae;Blastomonas;uncultured_bacterium;	40	South Korea, China	Microcystis culture, fresh water biofilm, ocean water, host microcystium pusillum, water, lake water, shallow lake associated with freshwater algae	Yes	Microcystis bloom (Dziallas and Grossart 2011)	M1, M2, M3, M4, P1, P2, P3, P4
<b>OTU_0590</b>	Bacteria;Bacteroidetes;Sphingobacteria;Sphingobacteriales;Chitinophagaceae;Hydrothales;uncultured_bacterium;	>100	China, Argentina, France, Estonia, United States of America,	Sand column from activated sludge, bacterioplankton from lake, wetland, pumice, lake water, grass carp	Yes	Microcystis bloom (Parveen et al. 2013)	Ana3



			Japan	intestine, drinking water system, particulate attached bacteria in lake water, oil contaminated groundwater, leachate concentrate, lake sediments, contaminated industrial wastewater, human gastrointestinal specimens			
<b>OTU_0881</b>	Bacteria;Planctomycetes;Phycisphaerae;Phycisphaerales;Phycisphaeraceae;SM1A02;uncultured_bacterium;	5	China	Surface sea water, sea water, lake water	Yes		M5
<b>OTU_2592</b>	Bacteria;Bacteroidetes;Cytophagia;Cytophagales;Cytophagaceae;Flexibacter;uncultured_Sphingobacteria_bacterium;	11	China, Greenland, Sweden	Marine sediments, bacterioplankton from lake, lake water	Yes	Cyanobacteria (Eiler and Bertilsson 2004)	Aph2, P2
<b>OTU_3249</b>	Bacteria;Proteobacteria;Alphaproteobacteria;MNG3;uncultured_bacterium;	39	The Philippines, Norway, Japan, China, United States of America, Israel, Australia, France, Germany	Rice root endophyte, mud association with rhizobiales, freshwater pond sediment, anaerobic bioreduction of nitrate in hydrogebase mb biofilm reaction, lake water, ferrovibrio denitrificans, oil contaminated groundwater, soil, association with Microcystis or other cyanobacteria, drinking water, contaminated soil, groundwater, sand column from activated sludge, magnetite mine drainage, algal bacteria consortia, croplands, activated sludge, fag leaf litter, cast of earthworm Aporrectodea caliginosa	Yes	Microcystis bloom (Shi et al. 2009)	Ana1, Ana2, Ana3, Aph2
<b>OTU_1070</b>	Bacteria;Proteobacteria;Betaproteobacteria;Burkholderiales;Comamonadaceae;Variovorax;uncultured_bacterium;	>100	China, United States of America, Argentina, Germany, Kryrgyzstan, Sweden, Antarctic, Iceland, Venezuela	Stream lake, water bay, drinking water, pumice, oligotrophic freshwater lake, groundwater, lake water, iron depositing microbial mat, water, Eutrophic lake sediment, activated	Yes	Microcystis bloom (Dziallas and Grossard 2011)	M5, P1, P2, P3, P5

				sludge, acidic lignite mine lake, membrane bioreactor, Oligotrophic limnopol lake, iron snow acidic coal mining, riverine rock, lake water, particule attached bacteria in eutrophic lake, glacial ice			
<b>OTU_0951</b>	Bacteria;Bacteroidetes;Flavobacteria;Flavobacteriales;Flavobacteriaceae;Flavobacterium;uncultured_organism;	19	China, United States of America, South Korea	Root, soil, freshwater wetlands, human skin, host Pleurotus astreatus, contaminated soil, drilling core, NY city subway air survey			M3
<b>OTU_0530</b>	Bacteria;Proteobacteria;Betaproteobacteria;Burkholderiales;Comamonadaceae;Hydrogenophaga;uncultured_bacterium;	>100	China, Portugal, Iran, United States of America, Italy, Japan, Russia	Groundwater Tibet plateau, Uranium contaminated mine water and sediments, chromite contaminated mine drainage water, arsenic contaminated mine, sulfuric spring, calcium carbonate beetles feed, rhizoplane, reactor treatment sewage, biofilm lake, subsurface aquifer sediment, mineral water, activated sludge, groundwater, saltmarsh sediment			Ana2, Ana3, Aph1, Aph2, M1, M3, M4, P2, P3, P4, P5
<b>OTU_1136</b>	Bacteria;Proteobacteria;Alphaproteobacteria;Rhodobacterales;Rhodobacteraceae;uncultured;Rhodobacter_sp._oral_taxon_C30;	51	Hungary, South Korea, France, China, Singapore, India, South Africa	Sludge, lake water, freshwater wetlands, eutrophic bay water, activated sludge, ornamental fish aquaria, concrete surface in storm water, biofilm attached top sulfur reactor, mucilaginous cyanobacterial aggregate, rhizosphere mercury contaminated sediments, biofilm from storm water canal, particule attached bacteria in eutrophic lake water, bacterioplankton in eutrophic lake	Yes	Microcystis bloom (Parveen et al. 2013; Xing et al. 2011)	M3, M4, M5, P3

				water, fermentation Microcystis blooms, river water, zebra fish digestive tract, rhizosphere, mine biofilm			
<b>OTU_2881</b>	Bacteria;Proteobacteria;Gammaproteobacteria;Xanthomonadales;Xanthomonadaceae;Thermomonas;uncultured_bacterium;	18	France, China, India, Bulgaria, Indonesia, United States of America, Israel, South Africa, Belgium	Lake water, warm/hot spring, paticule attached bacteria in eutrophic lake water, biofilm in freshwater, freshwater from strom canal, activated sludge with petrolen hydrocarbur content, shrimp pond, marine aquaculture, subsurface water, commercial nitrifying innoculum	Yes	Microcystis bloom (Parveen et al. 2013 et Shi et al. 2009)	M3
<b>OTU_3324</b>	Bacteria;Planctomycetes;Phycisphaerae;Phycisphaerales;Phycisphaeraceae;SM1A02;uncultured_bacterium;	3	China	Surface sea water, sea water			M5
<b>OTU_0593</b>	Bacteria;Bacteroidetes;Sphingobacteria;Sphingobacteriales;ST-12K33;uncultured_bacterium;	6	New Zealand, Russia	Activated sludge, biofilm on stone in lake			Ana3
<b>OTU_3544</b>	Bacteria;Bacteroidetes;Sphingobacteria;Sphingobacteriales;env.OPS_17;uncultured_bacterium;	0					Ana2, M2
<b>OTU_3035</b>	Bacteria;Proteobacteria;Alphaproteobacteria;Rhodospirillales;I-10;uncultured_Rhodospirillales_bacterium;	0					Ana3, Aph1, Aph2, P5
<b>OTU_2503</b>	Bacteria;Proteobacteria;Alphaproteobacteria;Rhizobiales;Rhizobiaceae;Rhizobium;Rhizobium_huautlense;	>100	China, Brazil, The Philippines, India, Finland, United States of America, Thailand	Root, host Attalaevigata, rhizosphere, surface seawater, rice endosphere, soil crust of copper mine, detrituisphere, soil from sunflower field, nodules, human skin, paper machine biofilm, zebrafish, urban			P4, P5

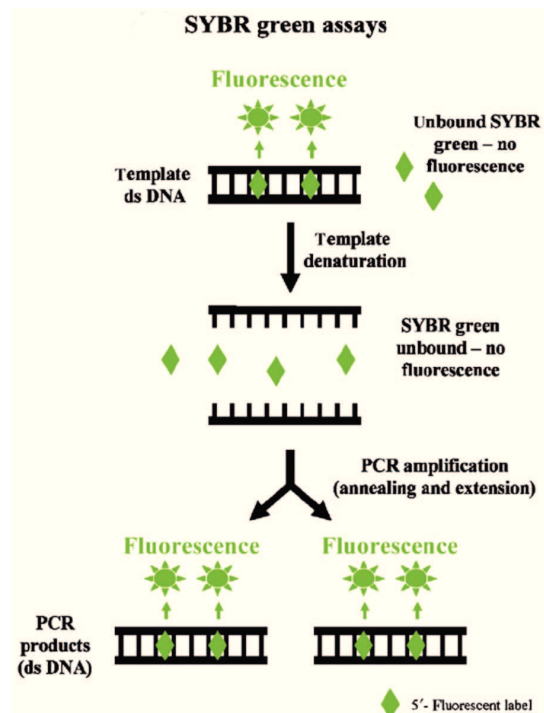
				aerosol, host lenna aquinoctalis, populus forest			
<b>OTU_2768</b>	Bacteria;Proteobacteria;Alphaproteobacteria;Rhodobacterales;Rhodobacteraceae;Rhodobacter;uncultured_Rhodobacter_sp.;	>100	Argentina, South Korea, Sweeden, China, Japan, France, United States of America	Pumice, water, river sediment, activated sludge, microalgae photobioreactor, periphyton, lake water, surface sediment, activated carbon for drinking water treatment, contaminated soil, hot spring, wastewater treatment, particule attached bacteria from lake water, river biofilm, sediment before freezing	Yes	Synechococcus leapoliensis	Ana2, P1, P2
<b>OTU_2999</b>	Bacteria;Proteobacteria;Alphaproteobacteria;Sphingomonadales;Erythrobacteraceae; Erythrobacter;uncultured_bacterium;	>100	Argentina, China, United States of America, United Kingdom	Pumice, lonar sediment surface rock, greenhouse soil, bacterioplankton eutrophic shallow lake, yellowstone mesothermic microbial mat, water lake, drinking water sys, sediment from lake, sulfuric spring, shrimp sediment	Yes	Spirulina mats	M3, M5, P2
<b>OTU_2571</b>	Bacteria;Proteobacteria;Alphaproteobacteria;Rhodospirillales;I-10;uncultured_alpha_proteobacterium;	18	Italy, New Zeland, United States of America, China	Lab reared specimen of Enchytraeus Cryptious, hypersaline springs, embryonic stage of Hydra Vulgaris, freshwater and freshwater stream biofilm, wastewater, hydrolic fracturing fluids and produced water, rice field, lake water and lake bacterioplankton, methane consuming sludge, rice paddy soil	Yes	Microcystis bloom (Shi et al. 2012), mucilaginous cyanobacterial bloom	Ana1, Ana3, Aph1, Aph2, M2, M4, M5, P3

## **6. Annexes 6 : La PCR quantitative**

De part son degré élevé de sensibilité et la possibilité d'analyser simultanément un nombre élevé d'échantillons, la méthode de PCR quantitative (appelé aussi PCR en temps réel) s'est développée ces dernières années en écologie microbienne, afin de caractériser les variations des communautés procaryotes et eucaryotes à différentes échelles de résolution taxonomiques (Valasek & Repa 2005, Smith & Osborn 2009).

La RT-PCR (pour Real Time Polymerase Chain Reaction) ou qPCR (pour PCR quantitative) est une technique automatisée permettant de quantifier rapidement un gène d'intérêt dans de nombreux échantillons. Cette approche repose sur une amplification PCR classique couplée à la quantification d'un signal fluorescent. L'intensité de fluorescence à chaque cycle de la PCR est directement proportionnelle à la quantité d'amplicons produite, elle-même directement proportionnelle à la quantité initiale d'ADN présente dans le milieu réactionnel.

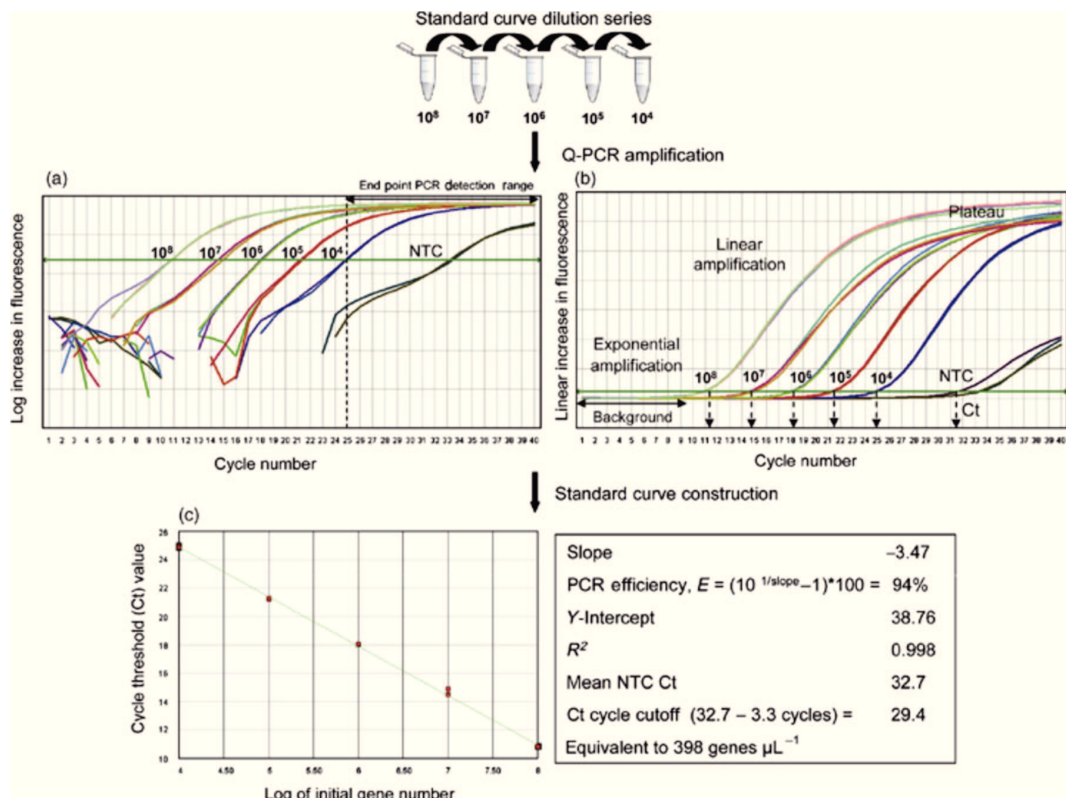
La méthode au SYBR Green est une des approches les plus utilisées en qPCR dans laquelle l'incorporation de cet intercalant dans la réaction de PCR permet de détecter l'ADN double brin généré durant la PCR, via un signal fluorescent (Figure 1). Plus l'échantillon est concentré en molécules cibles à l'origine, moins il faudra de cycles pour atteindre un point pour lequel le signal fluorescent est significativement supérieur au bruit de fond. Ce point est défini comme le Ct et apparaît en début de phase exponentielle.



**Figure 1: Détection au SYBR Green.** Le SYBR Green se lie à tout les ADN double brin et émet un signal fluorescent. Dans son état non lié, le SYBR Green ne fluoresce pas. L'amplification est donc mesurée à chaque cycle par l'augmentation de la fluorescence. (d'après Smith & Osborn 2009)

Lors de cette thèse, nous avons choisi d'opter pour une quantification dite absolue, qui se base sur l'utilisation d'une gamme étalon construite à partir de plasmides contenant le gène d'intérêt à des concentrations initiales connues. Une droite standard va représenter les valeurs de Ct obtenues expérimentalement en fonction du log des concentrations en molécules cibles fixes, issues de séries de dilutions des standards (Figure 2).

La valeur de Ct est inversement proportionnelle au log 10 de la concentration initiale en molécules cibles. Le Ct obtenu à partir d'un échantillon de concentration inconnue va ainsi être traduit en concentration en molécules cibles grâce à la droite standard.



**Figure 2: Amplification par qPCR de concentrations connues d'ADN pour construire des courbes standards utilisé pour la quantification de l'échantillons environnementale inconnu.** (a) graphique représentant l'augmentation de la fluorescence en fonction du nombre de cycle de l'ADN standard allant de 10<sup>4</sup> à 10<sup>8</sup> d'amplicons du gènes ciblé  $\mu\text{L}^{-1}$  (b) tracé linéaire indiquant les trois phases d'une amplification par PCR, les valeurs Ct correspondants pour chacune ADN standard amplifié et pour le NTC (no template control). (c) graphique représentant la régression linéaire simple des valeurs de Ct (de b) en fonction du log du nombre de gène initial.

Pour assurer la spécificité de l'amplification, une melting curve ou courbe de dissociation du produit amplifié peut être utilisée. En effet, après les cycles de la PCR, la température du mix est augmentée progressivement (avec un pas de +0.5°C) afin de déterminer la température correspond à la température de fusion de l'ADN ( $T_m$ ). Au fur et à mesure que la température augmente, l'ADN se dénature et la fluorescence diminue car le SYBR Green s'associe de moins en moins à de l'ADN double brin. Cette décroissance de fluorescence suit une courbe sigmoïde, le point d'inflexion de la courbe correspondant au moment où la majorité de l'ADN est dénaturée. Le  $T_m$  calculé sera donc fonction de la longueur du fragment amplifié et de sa composition de nucléotides. Ces courbes témoignent de l'amplification du bon gène. Si un seul gène est considéré, un seul pic doit être observé sur la courbe. Si un deuxième ou plusieurs autres pics apparaissent c'est que des dimères d'amorces

ou d'autres gènes non ciblés se sont amplifiés au cours de la PCR.

### Références Bibliographiques

**Hyman ED** (1988) A new method of sequencing DNA. *Anal Biochem* **174**:423–436

**Mardis ER** (2008) Next-generation DNA sequencing methods. *Annu Rev Genomics Hum Genet* **9**:387–402

**Margulies M, Egholm M, Altman WE, Attiya S, Bader JS, Bemben LA, Berka J, Braverman MS, Chen YJ, Chen Z, Dewell SB, Du L, Fierro JM, Gomes X V, Godwin BC, He W, Helgesen S, Ho CH, Ho CH, Irzyk GP, Jando SC, Alenquer MLI, Jarvie TP, Jirage KB, Kim J-B, Knight JR, Lanza JR, Leamon JH, Lefkowitz SM, Lei M, Li J, Lohman KL, Lu H, Makhijani VB, McDade KE, McKenna MP, Myers EW, Nickerson E, Nobile JR, Plant R, Puc BP, Ronan MT, Roth GT, Sarkis GJ, Simons JF, Simpson JW, Srinivasan M, Tartaro KR, Tomasz A, Vogt KA, Volkmer GA, Wang SH, Wang Y, Weiner MP, Yu P, Begley RF, Rothberg JM** (2005) Genome sequencing in microfabricated high-density picolitre reactors. *Nature* **437**:376–80

**Ronaghi M** (2001) Pyrosequencing Sheds Light on DNA Sequencing Pyrosequencing Sheds Light on DNA Sequencing. *Genome Res* **11**:3–11

**Smith CJ, Osborn AM** (2009) Advantages and limitations of quantitative PCR (Q-PCR)-based approaches in microbial ecology. *FEMS Microbiol Ecol* **67**:6–20

**Valasek MA, Repa JJ** (2005) The power of real-time PCR. *Adv Physiol Educ* **29**: 151–159







## **Diversité structurelle et fonctionnelle des communautés bactériennes de la phycosphère des cyanobactéries proliférant au sein des écosystèmes lacustres**

### **Résumé**

Les écosystèmes aquatiques eutrophes sont souvent perturbés par des proliférations de cyanobactéries potentiellement toxiques. Si de nombreux travaux ont été publiés sur leur écologie et leur toxicité, peu d'entre eux concernent leurs interactions avec les bactéries chimiotrophes qui leur sont associées au sein de la phycosphère, ce qui a motivé cette thèse. Par des travaux réalisés sur des écosystèmes naturels et des approches en laboratoire, nous montrons que les communautés bactériennes (CB) associées aux cyanobactéries ont une structure et une composition différentes de celles qui ne subissent pas leur influence directe. Ces communautés associées sont dominées par des bactéries ayant une forte affinité pour la matière organique (MO) et réunissant des espèces spécialistes toujours retrouvées en association avec des cyanobactéries et des espèces généralistes capables de se développer dans tous les environnements riches en MO. Nos travaux ont aussi révélé que les CB présentent des différences structurelles et fonctionnelles selon le genre de cyanobactéries auquel elles sont associées, et notamment selon leur capacité à fixer ou non l'azote atmosphérique. Enfin, un focus particulier a été porté sur les bactéries impliquées dans le cycle de l'azote sachant que cet élément est avec le phosphore, souvent limitant pour la croissance des cyanobactéries. Nos résultats montrent que plusieurs étapes essentielles de ce cycle semblent être plutôt effectuées par la CB qui n'est pas sous l'influence directe des cyanobactéries ce qui suggère l'existence d'un découplage dans l'exploitation de la MO et dans le cycle de l'azote entre CB associées et non associées aux cyanobactéries.

**Mots clés:** phycosphère; interactions cyanobactéries-bactéries; diversité structurelle et fonctionnelle; cycle de l'azote; écosystèmes lacustres; écologie microbienne; écologie moléculaire.

### **Structural and functional diversity of bacterial communities of bloom-forming freshwater cyanobacterial phycosphere**

#### **Abstract**

Potentially toxic cyanobacteria blooms often occur in eutrophic aquatic ecosystems. While many studies have been published on their ecology and toxicity, few have investigated the interactions between cyanobacteria and their associated chemotrophic bacteria within the phycosphere. This latter is the subject of this thesis. Using laboratory and *in situ* approaches we show that the structure and composition of bacterial communities (BC) associated with cyanobacteria are different from those that are not under the direct influence of the cyanobacteria. These associated communities are dominated by bacteria that have a high affinity for organic matter (OM) and are composed of specialist species that are always found in association with cyanobacteria and generalist species that can grow in OM rich environments. Our results reveal that the associated BC differs structurally and functionally between diazotrophic and non- diazotrophic cyanobacteria. We also specifically investigated the bacteria involved in the nitrogen cycle knowing that this element, with phosphorus, is often limiting for the growth of cyanobacteria. Our results show that several essential steps of the nitrogen cycle appear to be done by the BC that is outside of the direct influence of cyanobacteria. This suggests the existence of a decoupling of OM and nitrogen cycles between associated and non-associated BC.

**Keywords:** phycosphere; cyanobacteria-bacteria interactions; structural and functional diversity; nitrogen cycle; freshwater ecosystem; microbial ecology; molecular ecology.